



ТЕХНИЧЕСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ВАРНА



КАТЕДРА „РАСТЕНИЕВЪДСТВО”

ДИМИТЪР НИКОЛАЕВ НИКОЛОВ

**Изследване на антимикробни свойства на етеричномаслени култури
отглеждани в различни култивационни съоръжения**

**АВТОРЕФЕРАТ
НА
ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД
за присъждане на образователна и научна степен „Доктор”**

**Професионално направление: 6.1 „Растениевъдство“
Докторска програма: „Растениевъдство”**

**Научен ръководител:
доц. д-р Павлина Наскова**

Варна

2025

Дисертационният труд съдържа 169 страници, включително 83 таблици, 32 фигури, 2 приложения. Цитирани са 141 литературни източника, от които 37 на кирилица, 104 на латиница. Номерата на главите, формулите, фигурите, таблиците и цитираната литература в автореферата съответстват на тези в дисертационния труд.

Дисертантът е зачислен в свободна форма на обучение в катедра „Растениевъдство“ при МТФ на Технически университет-Варна.

Дисертационният труд е насочен за защита от съвета на

Защитата на дисертационния труд ще се състои на отч. в зала на Технически университет-Варна

Рецензиите, становищата на членовете на научното жури и авторефератът са публикувани в сайта на университета www.tu-varna.bg.

Материалите по защитата (дисертация, автореферат) са на разположение на интересувашите се в МТФ, катедра „Растениевъдство“. Адрес: Варна, ул. ”Студентска” №1.

Автор: **Димитър Николаев Николов**

Заглавие: Изследване на антимикробни свойства на етеричномаслени култури отглеждани в различни култивационни съоръжения

Тираж: 10 броя

ОБЩА ХАРАКТЕРИСТИКА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

ВЪВЕДЕНИЕ

Актуалност на проблема

Актуалността на проблема за изследване на антимикробните свойства на етеричномаслените култури е предизвикана от очерталата се в световен мащаб тенденция за търсенето на възможности за борба с бактериалните инфекции на хората и животните чрез по-безопасни и природоцелесъобразни лекарствени средства.

Методът на лечение с използването на синтетични антибиотици, продължава да е основен, но с времето микроорганизмите стават резистентни и антибиотиците губят своята ефективност, което е причината за терапевтични неуспехи и усложнения. Много често изкуствените антибиотици предизвикват допълнителни странични ефекти- появата на алергични реакции, наличието на сериозен токсичен ефект върху организма и понижен имунитет. Това поражда необходимостта да се търсят алтернативни антибактериални лекарства, съчетаващи противовъзпалително, антиоксидантно и антибактериално действие с цел по-нататъшно разработване и дълготрайна употреба на ефективни и безопасни лекарства, за лечение и профилактика на инфекциозни и възпалителни заболявания. В резултат на това през последните десетилетия значението на употребата на лечебни растения се увеличи неизмеримо. В света има около 12 000 растения, които се използват активно както в традиционната, така и в народната медицина. Тяхната терапевтична стойност е доказана с хилядолетна история на употреба и е научно обоснована с резултатите от предклинични и клинични изследвания. Биологично активните компоненти, които съставляват билковите препарати, принадлежат към голямо разнообразие от химични съединения, които по своята химическа структура са подобни или дори идентични с физиологично активните вещества на човешкото тяло. В резултат на това билковите лекарства се включват по-бързо в биохимичните процеси на човешкото тяло, отколкото синтетичните лекарства. Мекотата на действие на билковите препарати, липсата на токсични прояви по време на употребата им, определя тяхното нарастващо значение при лечението и профилактиката на различни заболявания. За разработване на ефективни фармакологични лекарства е необходимо да се подберат лечебни растителни суровини, съдържащи биологично активни компоненти с широк спектър на действие.

Според Световната здравна организация билковите лекарства съставляват значителна част от обема на фармацевтичната индустрия. Значителна част от населението в развиващите се страни използва лекарства от естествен произход като част от системата за първично здравеопазване. Глобалните продажби на билкови лекарства се оценяват на 26 милиарда долара през 2021 г. В същото време употребата на билкови лекарства на световния пазар се характеризира с нарастваща тенденция, като през следващите 10 години делът на билковите лекарства в общото потребление на фармацевтични продукти може да достигне 60%.

Несъмнено днес билковите препарати не могат напълно да заменят терапията с лекарства от синтетичен произход, но могат да намерят ефективна употреба в лечението.

Всичко това налага попълването на празнотите в знанията, в областта на изследване на потенциала на растителните извлекци и тяхното антимикробно действие, физикохимичния и химичен състав на извлекците, факторите оказващи влияние при тяхното приготвяне, различните техники на извличане на физиологично активните вещества. Много важно значение имат различните математически и статистически методи за обработване на получените данни.

На база гореизложеното може да се счита, че нивото на науката в областта на антимикробната активност на различни растителни видове и извлекците от тях до момента се характеризира с по- високо развитие на експерименталната част, обуславяща наличието на богат фактически материал и по – слабо развитие на теоретичната база и математическа обработка на резултатите, което се свежда до използването на неголям брой слабо свързани помежду си теории. Това е предпоставка за насочването на усилията към разработване и апробиране на модели за разпознаване и прогнозиране на антибактериалната активност на различни растителни извлекци без претенции за всеобхватност и пълнота на изложението. На тази база в дисертационния труд ще бъдат използвани някои достатъчно общи подходи на статистиката, които показват възможността за тяхното приложение в една конкретна задача по изследване на влиянието на суровинните и технологични фактори върху антибактериалната активност на екстрактивни разтвори.

Разработването на така посочените две направления определя целта на дисертационния труд:

Обща цел на дисертационния труд

Установяване на антибактериалните свойства на различни растителни видове, растителни фракции и технологии за изготвяне на екстрактивни разтвори, предназначени

за борба с конкретни патогени.

Задачи, произтичащи от общата цел

1. Провеждане на комплексен експеримент, основаващ се на отглеждане на шест растителни вида в различни условия като суровинна основа на бъдещите изследвания;

2. Разработване на методическите и практическите способности за получаване на екстрактивни разтвори от различни варианти на растителните видове, фракции и технологични основи на извличане;

3. Провеждане на почвени агрохимически анализи и определяне на почвената биогенност и биогенността на растителните извлеци за целия комплекс от експериментални данни, получени при различни условия;

4. Определяне на антимикробната активност на всички експериментално получени разтвори по отношение на пет вида патогенни микроорганизми;

5. Статистически анализ на влиянието на суровинните и технологични фактори върху антибактериалната активност на екстрактивните разтвори, получени при различни условия.

Обект и структура на изследването

Обект на изследването е оценката на антибактериалните свойства на екстрактивни разтвори, получени при различни условия, с цел използването им като бъдещи добавки за обеззаразяване на компост.

Това е определило структурата на дисертационния труд от три глави и приложение.

В първа глава са разгледани антибактериалният потенциал, химичният и физикохимичен състав, факторите на влияние и техниките за извличане на растителните извлеци. Описани са методичните основи и практическите способности за получаване на екстрактивните разтвори и на методите за почвен агрохимически анализ, за определяне на биогенността и на почвената ензимна активност.

Във втора глава са приведени резултатите от агрохимичните и микробиологични почвени анализи, оценките на микрофлората и на антибактериалния ефект на извлеките от растителни видове, отглеждани при различни условия.

В трета глава са представени резултатите от статистическия анализ на влиянието на суровинните и технологични фактори върху антибактериалната активност на екстрактивни разтвори, получени при различни условия.

Сравнителният анализ е проведен с използване на класическите методи за статистическо оценяване върху три категории данни:

- растения, отглеждани във вегетационна клетка при контролирани условия;
- растения, отглеждани в оранжерия готови за прилагане след 20-тия ден от изготвяне на разтвора;
- растения, отглеждани в оранжерия, готови за прилагане след 2-ри и 10-тия ден от изготвяне на разтвора.

В приложенията са приложени части от лабораторните методи и средства за решаване на задачите.

Методи на изследване

- Провеждане на първични експерименти, свеждащи се до отглеждане на изследваните растителни видове в различни условия;
- Методи за почвен агрохимичен анализ;
- Метод за определяне на биогенността;
- Методи за определяне на почвена ензимна активност;
- Методи за определяне на антимикробна активност.
- Методи, елементи и процедури на теорията на вероятностите и статистическите оценки;
- Методи на теорията на статистическите грешки;
- Методи за проверка на статистическите хипотези;
- Системен анализ.

Научна новост на дисертационния труд

Научната новост на дисертационния труд се състои в анализа на влиянието на факторите от суровинен и технологичен тип върху антибактериалния ефект на растителните извлеци. Новост с научно-приложен характер са процедурите и резултатите за оценка на информационните ценности на всички фактори, влияещи върху качеството на крайния продукт. С елементи на научно-приложна новост е доказаната статистическа идентичност на данните от растения отглеждани при условия, които преди това са били приемани като физически различни.

Личен принос на дисертанта

Основна част от резултатите и приносите в дисертационния труд са получени в процеса на работата на дисертанта в научния колектив, към който той принадлежи. Експерименталните изследвания в натурни и лабораторни условия и обработката на данните са проведени от докторанта под методическото ръководство на научния ръководите.

СЪДЪРЖАНИЕ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

ГЛАВА I

Обзорният анализ на състоянието на проблема следва проучването на потенциала на растителните извлеци и тяхното антимикуробно действие. Внимателно е проучен химичния състав на растителните извлеци, както и фитохимичния състав на изследваните растителни видове, които са шест – риган, мащерка, кориандър, джоджен, босилек и лавандула. Обследвана и описана е средата на отглеждане като фактор за натрупване на биоактивни вещества, както и фактори на влияние при приготвяне на растителни извлеци. Направен е обстоен опис на техниките и апаратите използвани за извличане на растителни извлеци.

1.2. Цел и задачи на експерименталните изследвания

Основната цел на дисертационния труд е да се проследи и анализира антимикуробната активност срещу патогенни микроорганизми, на различни варианти растителни екстракти получени от шест растителни вида, отглеждани в различни култивационни съоръжения и да се установи влиянието на условията на средата върху фитохимичния състав на извlecите.

За постигане на тази цел трябва да се решат следните конкретни задачи:

1. Подготовка и залагане на съдов опит с кориандър, джоджен, лавандула, босилек, мащерка и риган в оранжерия с неконтролирани условия на учебно–опитно поле при ТУ-Варна и в оранжерия с контролирана температура в Добруджански земеделски институт.
2. Разработване на методика и практични способи за получаване на екстрактивен разтвор в различни варианти на растителни видове, растителни фракции и технологични основи на извличане
3. Почвено-микробиологични анализи по основни агрохимични, микробиологични и ензимни анализи.
4. Залагане на различни варианти екстрактивни разтвори от изследваните растения.
5. Изследване на биогенността на растителните извleци по основни групи микроорганизми: неспорообразуващи и спорообразуващи бактерии, актиномицети, плесенни гъби.

6. Определяне на антимикробната активност на всички експериментално получени разтвори по отношение на оцет, вода, медицинско вино, медицински оцет и масло
7. Изследване на антимикробна активност на растителни екстрактивни разтвори от кориандър, джоджен, лавандула, босилек, мащерка и риган срещу следните патогенни микроорганизми: *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* и *Clostridium perfringens*.

1.2.1. Постановка на опита

Експериментът е проведен при контролирани условия в оранжерията на учебно-опитно поле на катедра „Растениевъдство“ към Технически университет – Варна и в Добруджански земеделски институт. Опитът е заложен с кориандър, джоджен, лавандула, босилек, мащерка и риган в две повторения на 21.02.2022 г. и 25.02.2023 г., като представените данни в дисертацията са усреднени за двете години.

1.2.2. Материал и методи на работа

1.2.2.1. Методика за получаване на екстрактивните разтвори в различни варианти

- **Декокт**, познат и под по-популярното име отвара, е течността, получена чрез заваряване на накълцания растителен продукт с необходимия разтворител, обикновено вода. Декоктът се състои в третиране на накълцания растителен продукт с необходимото количество вода и заваряването му. Препоръчва се основно за корените и кожите, съответно онези органи на билката, които са с по-дебела мембрана и чрез които проникването на активните вещества става по-трудно. Тази процедура се препоръчва при цветовете, листата, клонките или плодовете, и по специално, когато имаме за цел във водния екстракт да останат ценните летливи масла. Екстрактивният разтвор се филтрира горещ.
- **Тинктура**. От накълцаните билки се извличат терапевтични вещества, чрез накисване с етилов алкохол в концентрация 30 %, обикновено за време, вариращо между 8-10 дни. Операцията се извършва в добре затворени стъклени съдове.
- **Медицинско вино**. Въпреки че е стара фармацевтична форма, смятана от някои дори за преизпълнена, медицинското вино е и си остава адювантно терапевтично лекарство. Екстракцията се осъществява в слаба хидроалкохолна среда, при леко кисело рН. За приготвяне, предварително раздробените билки се накисват за 7-10 дни във вино (доброкачествено и добре стабилизирано), след което следва филтриране на препарата.

- **Медицински оцет.** Получава се чрез извличане на действащите вещества от растителни дроги с винен оцет. За приготвяне, предварително раздробените билки се накисват за 7-10 дни в оцет (доброкачествен), след което следва филтриране на препаратата.
- **Медицинските масла** представляват форма на накисване на билките в зехтин. Продължителността на накисване е 4-6 седмици. Съхранява се в добре затворени стъклени бутилки, на тъмно и прохладно.

От двата растителни вида, които са обект на изследване са заложили частични екстракти в следните варианти –корени, стъбло, листа както и цялостен екстракт (цяло растение).

Залагането и получаването на екстрактивните разтвори в различни варианти са извършени в лабораториите на ТУ – Варна.

1.2.2.2. Методи за почвен агрохимичен анализ

Агрохимичният анализ включва определянето на: съдържание на амониев и нитратен азот, подвижни фосфати и усвоим калий. Използвани са следните методи:

➤ Съдържанието на амониев азот ($\text{NH}_4 - \text{N}$) е определено фотометрично с индофенолово синьо в резултат на екстракция с разтвор на калциев дихлорид (CaCl_2). Нитратният азот ($\text{NO}_3 - \text{N}$) е определен фотометрично с Nitrospectral в резултат на екстракция с разтвор на калциев дихлорид (CaCl_2).

➤ Съдържанието на фосфор и калий е определено по двойно-лактатен метод на Егнер-Рийм. Методът се основава на извличане на подвижните съединения на фосфора и калия с разтвор на калциев лактат $(\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COO})_2\text{Ca}$, който е буфериран със солна киселина до рН 3,5-3,7, при съотношение почва-разтворител 1:50 и време на взаимодействие 90 min.

➤ Стойностите на почвената реакция са измерени потенциометрично с рН-метър съгласно изискванията на методиката за измерване рН на почва по международния стандарт ISO 10390:2005.

➤ Почвената влажност е определена на влагомерна везна, модел DBS.

1.2.2.3. Методи за определяне на биогенност

❖ Почвена биогенност

В почвите са изследвани следните основни групи аеробни мезофилни микроорганизми: неспорообразуващи бактерии, бацили, актиномицети, микромицети

(плесенни гъби) и бактерии, усвояващи минерален азот. Използван е методът на пределните разреждания и трикратни посевки на твърди хранителни среди (обикновен агар за неспорообразуващи бактерии и бацили; Actinomycetes isolation agar за актиномицети и бактерии, усвояващи минерален азот; Чапек-Докс агар за плесенни гъби) с последващо отчитане на колониеобразуващи единици (КОЕ) в 1 g абс. суха почва (Мишустин и Емцев, 1989; Малчева и Наскова, 2018; Нусторова и Малчева, 2020). Определена е общата микрофлора по формулата: неспорообразуващи бактерии + бацили + актиномицети + плесенни гъби. Изчислен е минерализационният коефициент по формулата: бактерии, усвояващи минерален азот / (неспорообразуващи бактерии+бацили) [22, 23, 25, 26].

❖ Биогенност на растителните извлеци

Биогенността на растителните екстракти е определена чрез изследване на следните систематични групи микроорганизми: неспорообразуващи и спорообразуващи (бацили) бактерии, актиномицети, плесенни гъби. Извършени са повърхностни посевки върху специфични хранителни среди (както за почвената биогенност), култивиране и отчитане на КОЕ в 1 ml екстракт.

1.2.3.. Методи за определяне на почвена ензимна активност

1.2.3.1. Каталазна активност на почвата

Каталазната активност е определена по мангано-метричен метод.

Активност на каталазата = ml KMnO_4 за титруване на контролата - ml KMnO_4 за титруване на пробата /опита/ = ml O_2 отделен за 30 мин.

1.2.3.2. Целулазна активност на почвата

При лабораторния опит за определяне на целулозоразлагащата активност, в петрита с диаметър 10 cm се насипва почва с дебелина около 7 mm, като се поддържа 60 % ППВ /пределна полска влагоемност/. Във всяко петри върху почвата се поставят по 3 ленти стерилна филтърна хартия с размери 10/50 mm и се култивират при 25 °C. През 10 дни се отчита площта на разградената целулоза с мрежа-еталон. Изчисляват се средни стойности от трите ленти.

1.2.4. Метод за определяне на антимикробна активност

Използва се агар-дифузионен метод (метод на ямките), като в 90 mm стерилни петриеви панички се разлива 25 ml втечнена и охладена специфична за всеки вид

микроорганизъм твърда хранителна среда [29] – Дезоксихолат цитрат агар за *Salmonella enterica*, Listeria agar за *Listeria monocytogenes*, Ендо агар за *Escherichia coli* Baird-Parker агар за *Staphylococcus aureus*, TSC агар за *Clostridium perfringens*. Със стерилен инструмент се изготвят ямки с диаметър 7 mm, на равно разстояние една от друга и на разстояние 2,5 cm от центъра на петрито. В ямките се инокулират растителни екстракти, обем 60 μ l. Инкубиране в термостат при 37 °C за 24h (необходимата температура и време за развитие на изследваните патогенни микроорганизми; анаеробно култивиране в джар за *Clostridium perfringens*). След култивиране се измерва с линия, в mm, т.нар. стерилна зона (задържане, потискане), респ. чувствителност на патогенния вид към определен растителен екстракт. Диаметърът на зоната е пропорционален на чувствителността на тествания микроорганизъм.

Съставът на агара влияе върху размера на зоната на задръжка чрез повлияване скоростта и степента на дифузия на растителния екстракт. Използваната среда трябва да е подходяща за дифузията на растителните екстракти, да не променя активността им и да е подходяща за растежа на изследвания микроорганизъм.

Основните критерии, по които се определя дали една среда е подходяща за дифузионните тестове, са следните:

- средата трябва да осигурява добър растеж микроорганизма;
- средата трябва да е подходящо буферирана, за да може да компенсира всички значими промени в рН по време на растежа на микроорганизмите;
- средата не трябва да влияе негативно на антимикробните агенти, с които се извършват тестовете за чувствителност;
- средата трябва да дава възпроизводими резултати при тестване с референтни щамове.

Въз основа на посочените критерии бяха избрани подходящите хранителни среди посочени по-горе. Върху тях бяха направени с пипета и шпатула плътни повърхностни посевки. Подготовка за посевка:

- дискът, съдържащ патогенен вид се рехидратира в смес от лактозо-сулфатен бульон и физиологичен разтвор в равни количества;
- плътна посевка върху специфична хранителна среда с 250 μ l от получения бульон, съдържащ определен патогенен вид;
- изготвяне на ямки;
- инокулиране в ямките на растителен екстракт 60 μ l.

Изготвят се антибиограми (отразява чувствителността на бактериалния щам към различни антибиотици, в случая различни растителни екстракти).

За посевките са използвани следните сертифицирани референтни материали:

- *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium NBIMCC 3669;
- *Listeria monocytogenes* NBIMCC 8749;
- *Escherichia coli* NBIMCC 3397;
- *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* NBIMCC 3359;
- *Clostridium perfringens* NBIMCC 8615.

Преди изследване на екстрактите и маслата за антибактериална активност е проведен санитарно-микробиологичен контрол за проверяване на микробиологичната чистота на вариантите. За изолиране на патогенна микрофлора са направени трикратни повърхностни посеви върху следните твърди хранителни среди: Desoxycholate citrate agar (*Salmonella* sp.), ChromoBio *Listeria* agar (*Listeria* sp.), Endo agar (*Escherichia coli* и колиформи), ChromoBio *Enterococcus* agar (*Enterococcus*).

ГЛАВА II. АНАЛИЗ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

2.1. Агрохимични почвени анализи

Агрохимични почвени показатели са изследвани в почвена проба без растителност (контрола) и при всеки растителен вид в края на вегетацията, за вариантите в оранжерия и във вегетационна клетка (таблици 1 и 2).

2.1.1. Агрохимични почвени анализи-оранжерийни условия

Агрохимичният почвен анализ за вариантите от оранжерията е представен в следващата таблица 1.

Таблица 1. Влажност, рН и хранителни елементи в почвите (оранжерия)

Вариант	Влажност (%)	рН	Хранителни елементи			
			NH ₄ mg/kg	NO ₃ mg/kg	P ₂ O ₅ mg/100 g	K ₂ O mg/100 g
Контрола	15,80	7,27	4,07	8,26	17,07	17,70
Кориандър	16,88	7,24	3,97	5,99	16,20	15,40
Джоджен	16,90	7,21	4,01	5,04	14,00	15,10
Босилек	16,74	7,23	3,95	5,98	16,00	15,20
Машерка	16,72	7,20	4,00	5,03	14,10	15,00
Лавандула	16,96	7,22	4,00	5,09	14,25	15,00
Риган	17,05	7,25	3,90	6,03	16,10	15,40

Активната реакция на почвите е неутрална. Съпоставяйки с граничните стойности за запасеност на почвата с достъпни азотни съединения, подвижни фосфати и усвоим калий, може да се направи извода, че почвите са слабо запасени с азот, но с добра степен на запасеност по отношение на фосфор и калий, а почвената реакция и влажност са относително благоприятни за развитието на растенията.

Влажността на почвите при вариантите с растителност е слабо по-висока спрямо контролата, докато стойността на рН при почвата без растителност е незначително по-висока в сравнение с вариантите с растителност. По отношение на вариантите с растителност рН е с най-висока стойност при риган, а с най-ниска при мащерка, като разликите са минимални. Почвената влажност е слабо по-висока при риган и лавандула, следват кориандър и джоджен, а с най-ниски стойности е при мащерка и босилек, като разликите са също незначителни.

Нитратният азот, усвоимите форми на фосфор и калий при вариантите с растителност са с по-ниски стойности спрямо контролата, което е показателно за тяхната добра усвояемост от растенията. Докато за амониевия азот тази тенденция е противоположна – амониевите йони са със слабо по-високи стойности при контролата. Почвените микроорганизми също могат да имобилизират химичните елементи в клетките си като по-този начин те се губят от почвата, което обаче е за малък период поради краткия живот на микроорганизмите – след тяхната гибел почвата се обогатява отново с натрупаните в микробите хранителни вещества.

По отношение на вариантите с растителност нитратният азот, усвоимите фосфор и калий са с по-високи стойности при риган, кориандър и босилек, а с по-ниски стойности при джоджен, мащерка и лавандула. За амониевия азот тенденцията е противоположна – по-високи стойности при джоджен, мащерка и лавандула, и по-ниски при риган, босилек и кориандър. Разликите в стойностите на химичните елементи при отделните растения са незначителни, с изключение за фосфор – елементът за който се установяват разлики между отделните растения от около 2 mg/100g P₂O₅ – по-ниски при джоджен, мащерка и лавандула, и по-високи при кориандър, риган и босилек.

2.1.2. Агрохимични почвени анализи-вегетационна клетка

Стойностите на рН, влажността и хранителните елементи в почвата слабо се повишават при вариантите от вегетационната клетка, като описаните тенденции за вариантите от оранжерията се запазват (таблица 2).

Таблица 2. Влажност, рН и хранителни елементи в почвите (клетка)

Вариант	Влажност (%)	рН	Хранителни елементи			
			NH ₄ mg/kg	NO ₃ mg/kg	P ₂ O ₅ mg/100 g	K ₂ O mg/100 g
Контрола	15,92	7,30	4,12	8,31	17,16	17,80
Кориандър	16,97	7,27	4,03	6,08	16,31	15,54
Джоджен	17,00	7,25	4,08	5,15	14,13	15,23
Босилек	16,88	7,26	4,01	6,06	16,11	15,34
Мащерка	16,85	7,22	4,06	5,13	14,22	15,10
Лавандула	17,10	7,26	4,06	5,20	14,36	15,14
Риган	17,14	7,28	3,98	6,15	16,20	15,55

2.2. Микробиологични и ензимни почвени анализи

2.2.1. Микробиологични почвени анализи

Изследвана е микробиологичната (таблици 3 и 4) активност на почвите без растителност (контрола) и с растителност, в края на вегетацията – за двата варианта на култивиране – в оранжерийни условия и във вегетационна клетка.

2.2.1.1. Микробиологични почвени анализи-оранжерийни условия и вегетационна клетка

Биогенността на почвите в оранжерийни условия е по-висока при отглежданите култури спрямо контролата (без растителност) (табл. 3).

Таблица 3. Количество и качествен състав на почвените микроорганизми (КОЕх10³/абс. суха почва) (оранжерийни условия)

Култура	Обща микро-флора	Неспоро-образуващи бактерии	Бацили	Актино-мицети	Микро-мицети	Бактерии, усвояващи минерален азот
Контрола	3259,2	2667,2	400	57,6	134,4	4920
Кориандър	4102	2953,6	506,8	292	349,6	5936,4
Джоджен	3932,8	2860	452,4	282	338,4	5460
Босилек	4082	2940	500	290	352	5920
Мащерка	3890	2820	450	280	340	5400
Лавандула	3980	2900	460	280	340	5800
Риган	4160	2980	500	300	380	5920

Най-високо е общото количество микроорганизми при отглеждането на риган, кориандър и босилек, следват джоджен и лавандула, а най-ниска почвената биогенност при отглеждане на мащерка.

Минерализационният коефициент, показващ скоростта на разграждане на органичните вещества в почвите като отношение между бактериите, усвояващи минерален азот и амонификаторите (неспорообразуващи бактерии и бацили), е с най-висока стойност при лавандула и с най-ниска при джоджен. Следователно количеството на микроорганизмите не е единствен фактор за тяхната активност. Влияние за минерализационната активност на почвите оказват комплекс от фактори – температура и влажност на почвите, рН, механичен състав, съдържание на хранителни вещества в почвите и други фактори. При вариантите с по-висока биогенност лавандула, босилек, кориандър и риган е по-висока минерализационната активност, но не съответства най-висока биогенност с най-високи стойности на минерализационен коефициент (фиг. 1).



Фиг. 1. Минерализационен коефициент (оранжерийни условия)

Биогенността на почвите при вариантите от вегетационната клетка нараства спрямо тази при оранжерийни условия (таблица 4).

**Таблица 4. Количество и качествен състав на почвените микроорганизми
(КОЕх10³/абс. суха почва) (вегетационна клетка)**

Култура	Обща микро-флора	Неспоро-образуващи бактерии	Бацили	Актино-мицети	Микро-мицети	Бактерии, усвояващи минерален азот
Контрола	3391,6	2720,8	440	70	160,8	5000
Кориандър	4280,8	3020,8	540	320	400	6000
Джоджен	4060,6	2900,6	500	300	360	5620
Босилек	4240,8	3000	540	320	380,8	6000
Мащерка	4021,2	2880	480,8	300	360,4	5600
Лавандула	4260	3000	540	320	400	6000
Риган	4360,4	3060,4	540	340	420	6000

Отново се установява, че общото количество микроорганизми нараства в почвите с растителност, като биогенността е по-висока при риган, лавандула, кориандър и босилек, и по-ниска при джоджен и мащерка.

Минерализационната активност слабо нараства само при джоджен и мащерка спрямо вариантите в оранжерийни условия, което още веднъж доказва, че количеството на микроорганизмите не винаги е основен фактор определящ тяхната активност (фиг. 2).

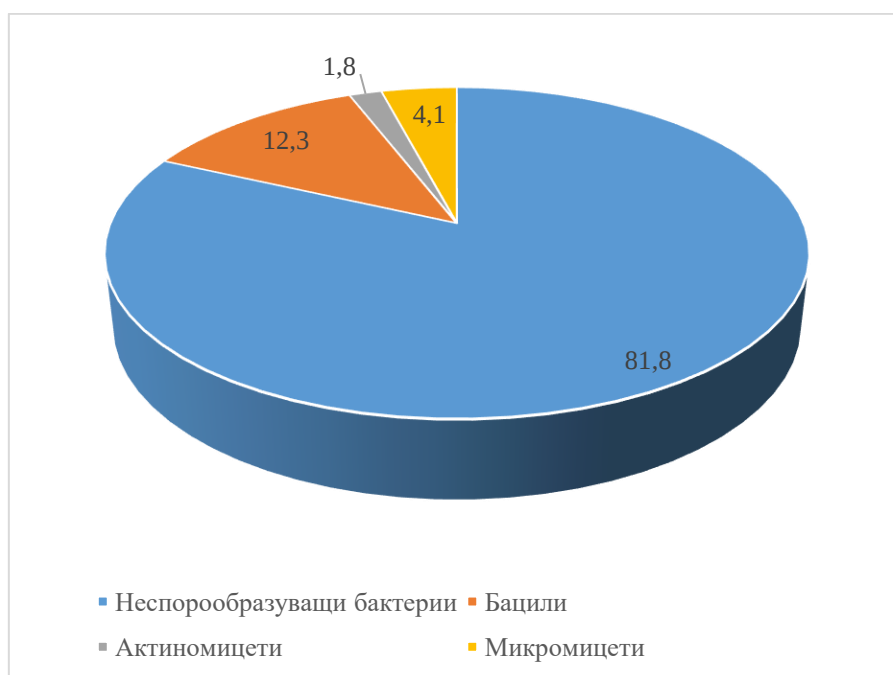


Фиг. 2. Минерализационен коефициент (вегетационна клетка)

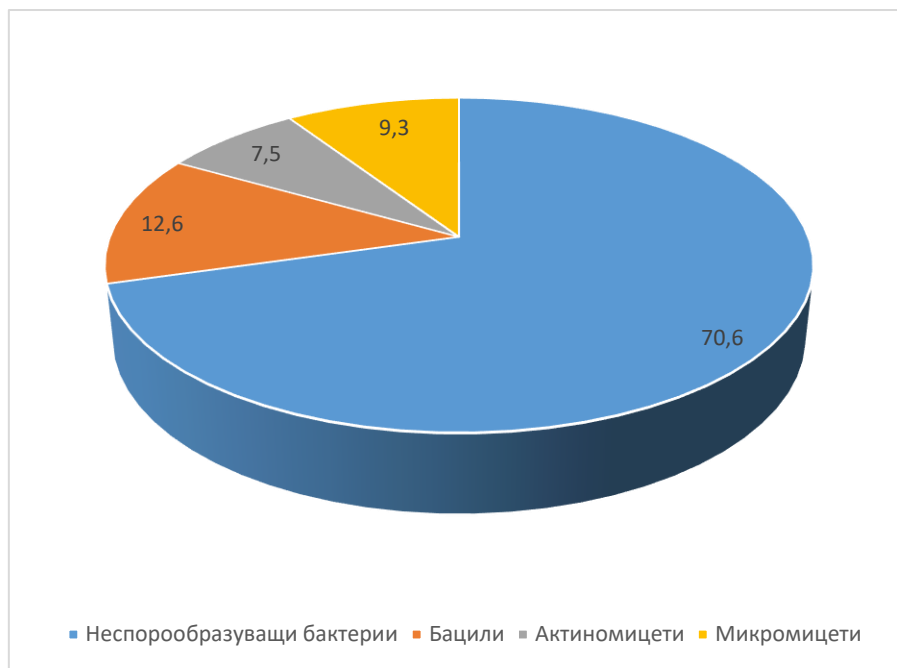
Скоростта на минерализация е най-висока при босилек, лавандула и кориандър, а по-ниска при джоджен, мащерка, риган и контролата.

И за двата варианта – оранжерия и вегетационна клетка основен дял в състава на общата микрофлора заемат неспорообразуващите бактерии, следвани от бацилите, а по-слабо представени са актиномицетите и микромицетите (плесенни гъби). По принцип амонификаторите (неспорообразуващи бактерии и бацили) имат основна роля в началните етапи на деградация на органичните вещества, докато актиномицетите и микромицетите са по-активни в по-крайните етапи на разграждане на органиката.

Установява се увеличаване на количеството на актиномицетите и микромицетите за сметка на намаляване на неспорообразуващите бактерии с около 8-10% при вариантите с растителност спрямо контролата, както при оранжерийни условия, така и във вегетационна клетка (фиг. 3 и фиг. 4).



Фиг. 3. Процентно разпределение на почвените микроорганизми при контролата (оранжерийни условия)



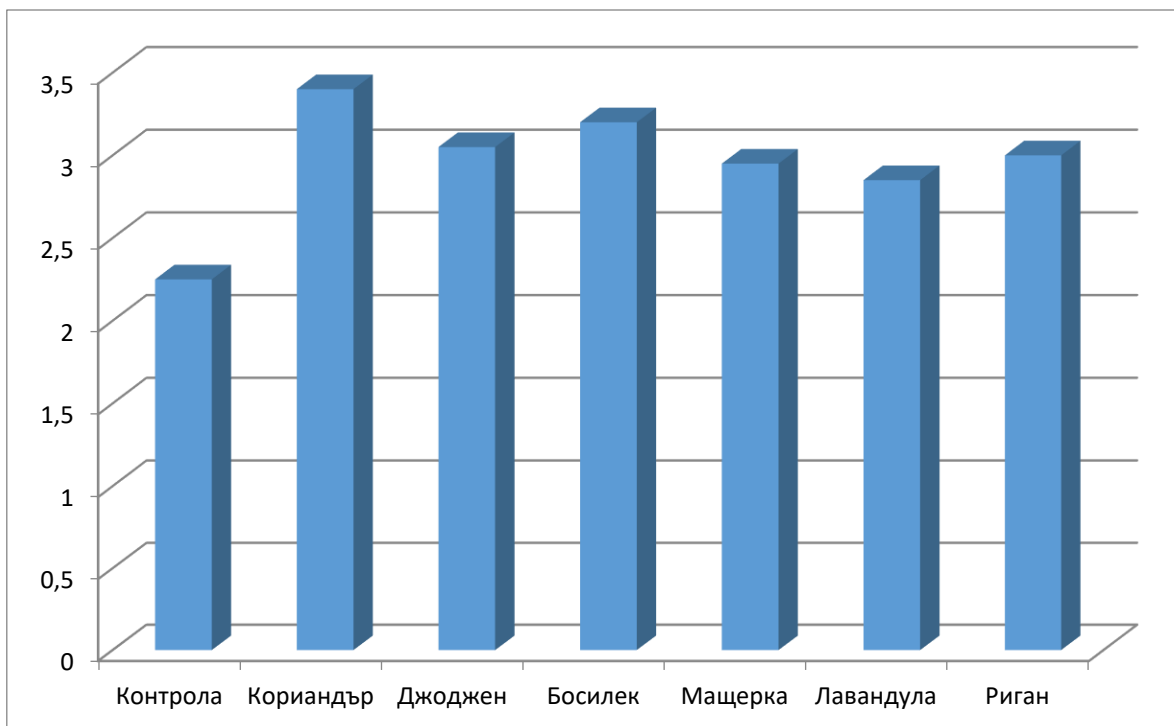
Фиг. 4. Процентно разпределение на почвените микроорганизми при кориандър (вегетационна клетка)

2.2.2. Почвени ензимни анализи

Изследвана е ензимната активност на почвите преди засяване на растенията и в края на вегетацията – за двата варианта на култивиране – в оранжерийни условия и във вегетационна клетка.

2.2.2.1. Почвени ензимни анализи-оранжерийни условия

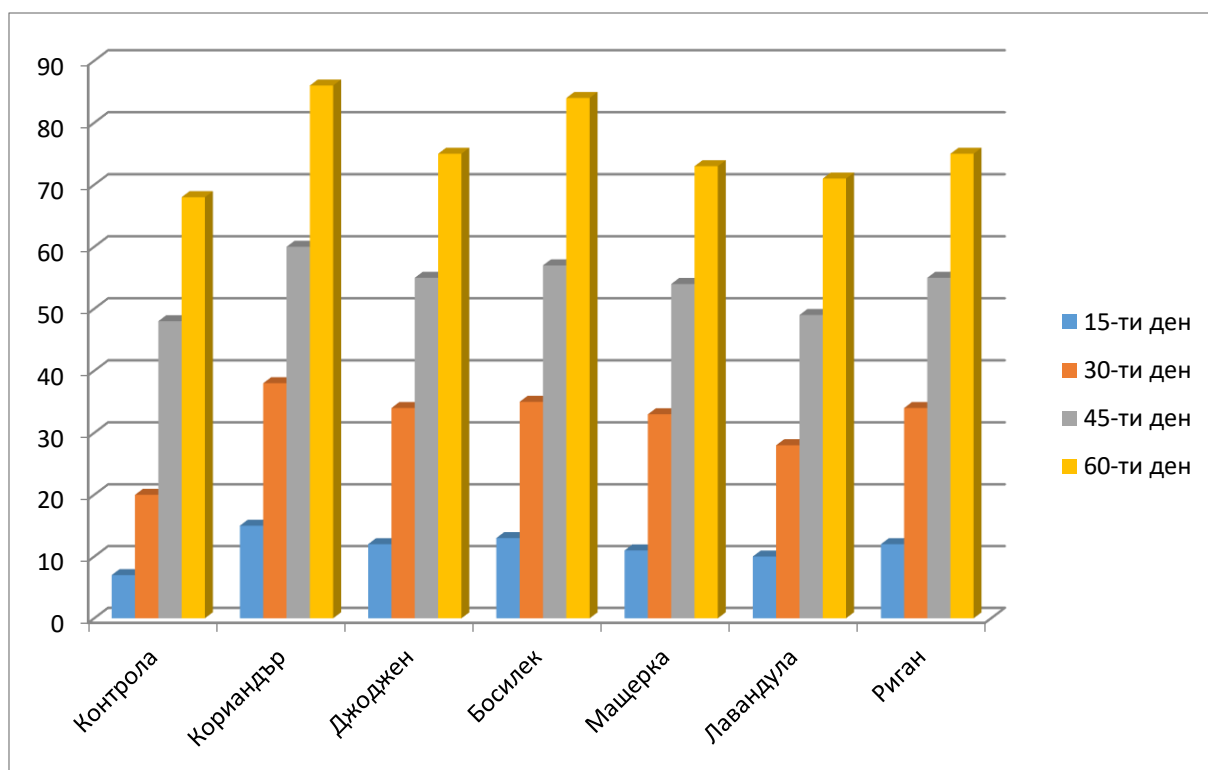
Каталазната активност на почвените микроорганизми при вариантите в оранжерийни условия е представена на следващата фигура 5.



**Фиг. 5. Каталазна активност на почвените микроорганизми (ml O₂/30 min)
(оранжерийни условия)**

Наличието на растителност повишава стойностите на каталазата спрямо контролата (без растителност). Най-висока е каталазната активност при джоджен, а най-ниска при лавандула.

Целулазната активност на почвените микроорганизми за растенията отглеждани в оранжерийни условия е представена на следващата фигура 6.

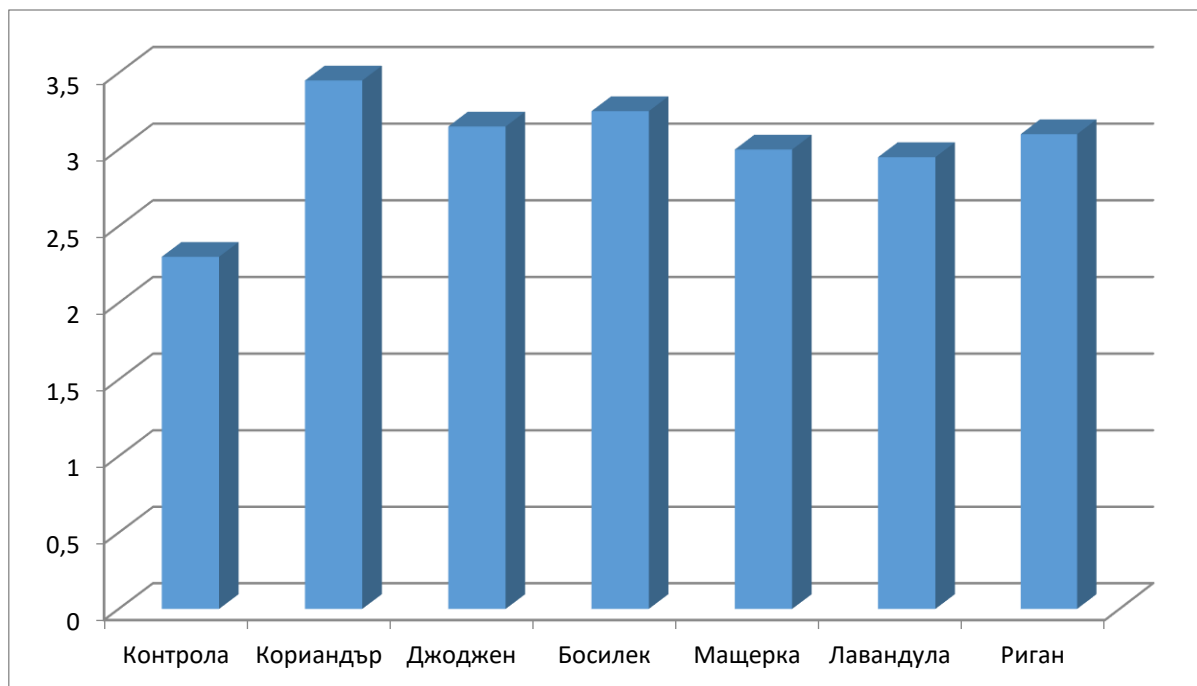


Фиг. 6. Целулазна активност на почвените микроорганизми (% разградена площ) (оранжерийни условия)

Отглеждането на растителност повишава стойностите на целулазата спрямо контролата, без растителност. Най-висока е целулазната активност при кориандър, а най-ниска при лавандула, както при каталазната активност.

2.2.2.2. Почвени ензимни анализи-вегетационна клетка

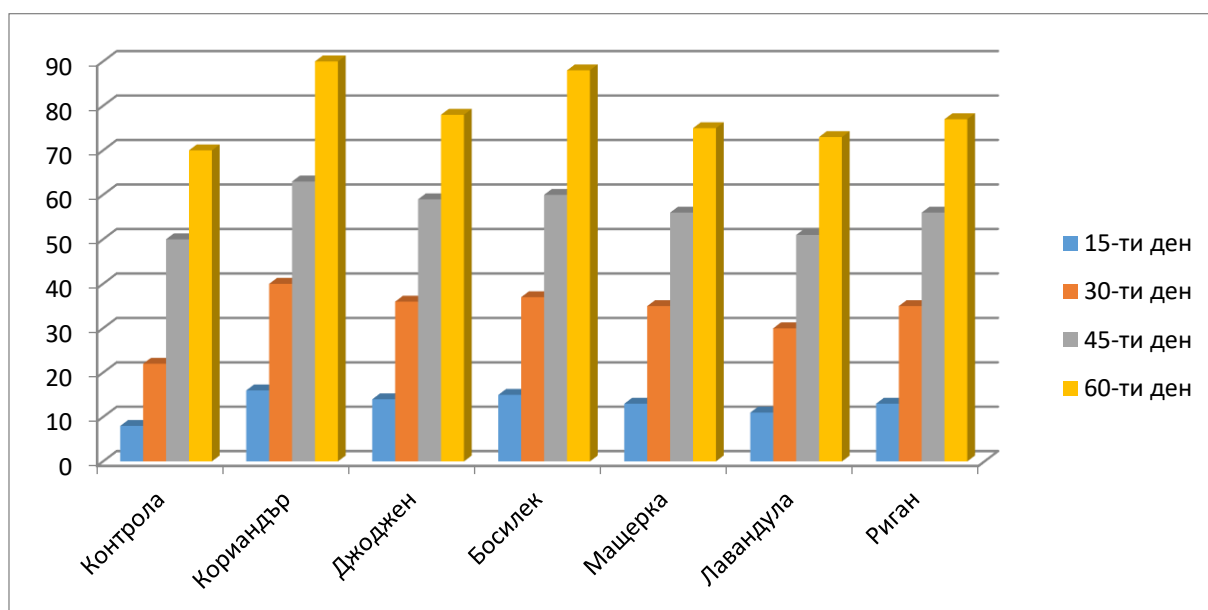
При растенията отгледани във вегетационна клетка каталазната активност е по-висока спрямо тези отгледани в оранжерийни условия, което корелира с общото количество на микроорганизмите (фиг. 7).



Фиг. 7. Каталазна активност на почвените микроорганизми (ml O₂/30 min) (вегетационна клетка)

Отново се установява, че каталазната активност на почвените микроорганизми се увеличава при наличието на растителност, като най-висока е при кориандър, а най-ниска при лавандула.

Целулазната активност при вариантите от вегетационната клетка слабо се повишава (фиг. 8).



Фиг. 8. Целулазна активност на почвените микроорганизми (% разградена площ) (вегетационна клетка)

Отново целулазната активност на почвените микроорганизми при вариантите от вегетационната клетка е по-висока при наличието на растителност, като най-високи стойности на целулазата се установяват при кориандър, а най-ниски при лавандула.

2.3. Микрофлора на растителните извлеци

При всички варианти на изследване не е установено наличие на патогенна микрофлора: *Escherichia coli* и колиформи, *Salmonella* sp., *Listeria* sp., *Enterococcus*.

Биогенността на растителните извлеци е представена чрез изследване на неспорообразуващи бактерии, спорообразуващи бактерии (бацили), актиномицети и микромицети (плесенни гъби), на 2-ри, 10-ти и 20-ти ден от приготвяне на извlecите, при отглеждане на растенията в оранжерийни условия и във вегетационна клетка.

2.3.1. Микрофлора на растителните извлеци-оранжерийни условия и вегетационна клетка

При вариантът с разтворител вода (декокт) се установява най-високо количество на обща микрофлора, по-високо при извlecите с цяло растение и корени. Очевидно този разтворител създава най-добри условия подходящи за размножаването на аеробни групи микроорганизми, независимо, че единствено при този вариант има варене и част от микроорганизмите са загинали, особено неспорообразуващите. Попадайки в почвата или други органични субстрати (компост) тези микроорганизми играят основна роля за плодородието, кръговрата на веществата, деструкцията на органичните вещества. Следователно по отношение на микрофлора полезна за почвеното плодородие и развитието на растителността вариант декокт е най-подходящ за използване като микробиална добавка към почвите и в процеса на компостиране.

Общото количество микроорганизми е най-високо при използването на корени спрямо останалите растителни части за вариантите тинктура, медицинско вино, медицинско масло и медицински оцет, и на второ място при декокт. Епифитните микроорганизми от ризоплана на корените най-добре продължават да се развиват в използваните разтворители при приготвянето на екстрактите. Като цяло при вариантът с разтворител вода биогенността е най-висока, а най-ниска биогенност за всички растения се установява при използването на листа с разтворител оцет. Най-високо общо количество микроорганизми е установено при риган цяло растение, вариант декокт, 20-ти ден от приготвянето, което корелира с най-висока почвена биогенност при отглеждане на риган. Най-ниско общо количество микроорганизми се установява при мащерка листа,

следва джоджен листа, вариант медицински оцет, 2-ри ден от приготвянето, което корелира с най-ниска почвена биогенност при тези растения.

При вариант декокт основен дял в състава на общата микрофлора заемат неспорообразуващите бактерии, следвани от бацилите, а по-слабо представени са актиномицетите и плесенните гъби. Докато при останалите варианти се установява прегрупиране в състава на общата микрофлора. При вариант „медицински оцет“ количествата на актиномицетите и микромицетите (с превес за актиномицетите) са по-високи спрямо тези на неспорообразуващите бактерии и бацилите. Като цяло при използването на корени количеството на неспорообразуващи бактерии е най-високо, бацилите и актиномицетите са с близки стойности, а по-слабо представени са микромицетите, с изключение при вариант „медицински оцет“ – по-киселата среда създава по-добри условия за развитие на мицеларните групи микроорганизми – плесенни гъби и актиномицети. При тинктура листа и стъбла, както и при медицинско вино и медицинско масло листа, стъбла и цяло растение се установяват близки или по-високи стойности на бацили и актиномицети спрямо неспорообразуващи бактерии.

Установява се като цяло повишаване на биогенността на екстрактите и маслата от 2-ри към 20-ти ден от приготвянето им.

Изследвани са и комбинирани варианти, с основа декокт – вариантът с разтворител вода (таблица 5).

Като цяло при смесването на вариантите биогенността намалява, като е най-висока при комбинирането на декокт и тинктура, и най-ниска при комбинирането на декокт и медицински оцет (с изключение за медицински оцет стъбла и цяло растение). По отношение на отделните растителни части и цяло растение най-високо е общото количество микроорганизми при използването на корени. Биогенността нараства от 2-ри към 20-ти ден от смесването на извлеките. Най-висока биогенност при комбинираните варианти се установява за кориандър и лавандула, а най-ниска за мащерка и джоджен.

Като цяло биогенността на извлеките от растенията отгледани във вегетационна клетка нараства спрямо тези от оранжерията, като тенденциите се запазват сходни (табл. 6).

Таблица 5. Биогенност на комбинирани извлеци от кориандър (оранжерия)

Вариант: Кориандър	Растителна част	Неспоро- образуващи бактерии	Бацили	Актино- мицети	Микро- мицети	Обща микрофлора
2-ри ден след смесването						
Декокт+Тинктура	Корени	1460	640	540	40	2680
	Листа	340	320	340	20	1020
	Стъбла	360	360	320	20	1060
	Цяло растение	480	180	280	40	980
Декокт + Медицински оцет	Корени	120	40	800	80	1040
	Листа	80	40	200	80	400
	Стъбла	60	40	780	80	960
	Цяло растение	120	200	440	100	860
Декокт + Медицинско вино	Корени	800	300	280	60	1440
	Листа	200	360	140	20	720
	Стъбла	120	260	220	40	640
	Цяло растение	360	360	240	20	980
Декокт + Медицинско масло	Корени	620	240	200	40	1100
	Листа	160	200	160	0	520
	Стъбла	140	200	160	20	520
	Цяло растение	200	200	180	60	640
10-ти ден след смесването						
Декокт+Тинктура	Корени	1480	660	560	40	2740
	Листа	360	340	360	40	1100
	Стъбла	360	360	360	20	1100
	Цяло растение	500	200	320	40	1060
Декокт + Медицински оцет	Корени	140	60	800	80	1080
	Листа	80	40	240	80	440
	Стъбла	60	40	780	80	960
	Цяло растение	140	220	460	100	920
Декокт + Медицинско вино	Корени	820	320	280	60	1480
	Листа	220	360	160	40	780
	Стъбла	140	280	220	40	680
	Цяло растение	360	380	260	20	1020
Декокт + Медицинско масло	Корени	640	240	200	40	1120
	Листа	180	220	160	20	580
	Стъбла	160	200	180	20	560
	Цяло растение	220	220	200	60	700
20-ти ден след смесването						
Декокт+Тинктура	Корени	1500	680	580	60	2820
	Листа	380	360	380	40	1160
	Стъбла	380	380	380	40	1180
	Цяло растение	520	220	360	40	1140

Декокт + Медицински оцет	Корени	140	60	820	100	1120
	Листа	80	60	260	80	480
	Стъбла	80	40	800	80	1000
	Цяло растение	160	220	500	100	980
Декокт + Медицинско вино	Корени	840	340	300	60	1540
	Листа	260	380	200	40	880
	Стъбла	180	300	220	40	740
	Цяло растение	380	400	300	20	1100
Декокт + Медицинско масло	Корени	660	260	220	40	1180
	Листа	200	220	180	20	620
	Стъбла	180	220	180	20	600
	Цяло растение	240	240	200	60	740

Таблица 6. Биогенност на комбинирани извлекци от лавандула (клетка)

Вариант: Лавандула	Растителна част	Неспоро- образуващи бактерии	Бацили	Актино- мицети	Микро- мицети	Обща микро- флора
2-ри ден след смесването						
Декокт+Тинк- тура	Корени	1460	660	540	40	2700
	Листа	360	340	360	20	1080
	Стъбла	360	360	320	20	1060
	Цяло растение	480	180	300	40	1000
Декокт + Медицински оцет	Корени	140	60	800	80	1080
	Листа	80	40	200	80	400
	Стъбла	60	40	760	80	940
	Цяло растение	140	200	420	100	860
Декокт + Медицинско вино	Корени	780	300	300	60	1440
	Листа	200	380	140	20	740
	Стъбла	160	260	240	40	700
	Цяло растение	360	340	240	40	980
Декокт + Медицинско масло	Корени	620	220	200	40	1080
	Листа	160	200	160	0	520
	Стъбла	160	180	180	20	540
	Цяло растение	200	200	200	60	660
10-ти ден след смесването						
Декокт+Тинк- тура	Корени	1500	700	560	40	2800
	Листа	380	360	360	40	1140
	Стъбла	360	380	320	20	1080
	Цяло растение	500	220	320	40	1080

Декокт + Медицински оцет	Корени	140	60	820	80	1100
	Листа	80	60	240	80	460
	Стъбла	80	40	760	80	960
	Цяло растение	160	220	420	100	900
Декокт + Медицинско вино	Корени	800	320	320	60	1500
	Листа	240	380	180	20	820
	Стъбла	200	260	240	40	740
	Цяло растение	400	360	240	40	1040
Декокт + Медицинско масло	Корени	620	240	200	60	1120
	Листа	200	200	180	20	600
	Стъбла	160	200	180	20	560
	Цяло растение	260	240	220	60	780
20-ти ден след смесването						
Декокт+Тинк- тура	Корени	1540	740	580	40	2900
	Листа	400	380	360	40	1180
	Стъбла	380	380	340	40	1140
	Цяло растение	540	240	320	40	1140
Декокт + Медицински оцет	Корени	160	80	820	80	1140
	Листа	80	60	280	80	500
	Стъбла	80	40	760	80	960
	Цяло растение	160	220	460	100	940
Декокт + Медицинско вино	Корени	820	360	320	60	1560
	Листа	240	380	200	40	860
	Стъбла	220	300	240	40	800
	Цяло растение	440	360	240	40	1080
Декокт + Медицинско масло	Корени	620	240	200	60	1120
	Листа	200	220	180	40	640
	Стъбла	200	220	200	20	640
	Цяло растение	280	240	240	60	820

2.4. Антимикробна активност на растителните извлеци

За всички растителни извлеци е установена антибактериална активност срещу *Escherichia coli*, слабо нарастваща за растенията отгледани във ветацйонна клетка спрямо тези от оранжерията. Растителните извлеци не показаха антимикробна активност срещу другите изследвани патогенни микроорганизми: *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* и *Clostridium perfringens*.

2.4.1. Антимикробна активност на растителните извлеци - оранжерийни условия

Антибактериалната активност на растителните извлеци срещу *Escherichia coli* като цяло е най-висока при вариантите на 20-ти ден след приготвянето им (табл. 7). Антимикробната активност на 48-мия час след посяването за *Escherichia coli* и екстрактите се повишава слабо или остава същата спрямо отчетената на 24-тия час.

По-висока антибактериална активност на растителните корени се установява при вариантите декокт, медицински оцет и медицинско масло, а по-ниска при вариантите тинктура и медицинско вино. Устойчиво най-висока антибактериална активност се установява за корените на кориандър, а най-ниска антибактериална активност е регистрирана при корените на риган, варианти тинктура и медицинско вино. Тази по-ниска антибактериална активност при риган обаче не е характерна за всички използвани разтворители – при вариант медицинско вино тя се повишава и е на второ място след кориандър.

По отношение на вариантите с корени от кориандър и джоджен стерилната зона намалява в следния ред: медицинско масло > медицински оцет > декокт > тинктура > медицинско вино.

По отношение на вариантите с корени от босилек и мащерка стерилната зона намалява в следния ред: декокт > медицинско масло = тинктура > медицински оцет > медицинско вино.

По отношение на вариантите с корени от лавандула стерилната зона намалява в следния ред: медицински оцет > медицинско масло > декокт > тинктура = медицинско вино.

По отношение на вариантите с корени от риган стерилната зона намалява в следния ред: медицински оцет > медицинско масло = тинктура > декокт > медицинско вино.

Антибактериалната активност на листата е най-висока при риган и лавандула, медицински оцет, следва кориандър и босилек (медицинско масло и медицински оцет), както и риган, медицинско масло. Най-ниска антимикробна активност срещу *Escherichia coli* се установява при джоджен и кориандър, вариант декокт. Като цяло най-ниски са стойностите на стерилната зона при джоджен, следва мащерка, но с изключение на вариант декокт.

В сравнение с екстрактите от корен стерилната зона при екстрактите от листа на кориандър, джоджен, босилек и мащерка като цяло са с по-ниски стойности, което

показва, че корените им са с по-ефективен ефект срещу *Escherichia coli* спрямо листата им.

Тинктурата и медицинското масло при екстрактите от корен на лавандула са по-ефективни срещу *Escherichia coli* спрямо листата на растението. Докато медицинският оцет от листа на лавандула има по-висок антибактериален ефект спрямо медицинският оцет с корени от лавандула. Тинктура, медицински оцет, медицинско масло и медицинско вино от листа на риган имат по-голяма стерилна зона спрямо същите варианти с корени от риган. Декокт от корени на риган има по-силен антибактериален ефект спрямо декокт от листа на риган, докато стерилната зона на декокт от корени и листа е с еднаква стойност.

По отношение на вариантите с листа от кориандър и джоджен стерилната зона намалява в следния ред: медицинско масло > медицински оцет > тинктура > медицинско вино > декокт.

По отношение на вариантите с листа от босилек и мащерка стерилната зона намалява в следния ред: медицинско масло = медицински оцет > декокт > медицинско вино > тинктура.

По отношение на вариантите с листа от риган и лавандула стерилните зони намаляват в следните редове:
медицински оцет > медицинско масло > декокт = тинктура = медицинско вино (риган);
медицински оцет > декокт = медицинско вино > медицинско масло > тинктура (лавандула).

Таблица 7. Антимикробна активност на изследваните екстракти (цяло растение, оранжерия, 20-ти ден)

Вариант: Цяло растение	Стерилна зона, cm											
	Кориандър		Джоджен		Босилек		Мащерка		Лавандула		Риган	
Час	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48
Декокт	0,2	0,3	0,2	0,3	0,8	0,9	0,7	0,8	1,3	1,4	0,8	0,9
Тинктура	0,9	1,0	0,6	0,7	0,6	0,7	0,5	0,6	0,8	0,9	0,5	0,6
Медицински оцет	1,5	1,5	1,0	1,1	1,0	1,1	0,9	0,9	1,4	1,5	1,5	1,6
Медицинско вино	0,8	0,9	0,5	0,6	0,7	0,7	0,6	0,7	0,6	0,7	0,6	0,7
Медицинско масло	1,5	1,5	1,1	1,1	0,7	0,9	0,6	0,7	0,6	0,7	0,9	1,0

Антибактериалната активност на целите растения е най-висока при медицински оцет за всички растения, както и при медицинско масло за кориандър и джоджен. Най-нисък ефект се установява при кориандър и джоджен, вариант декокт. Като цяло общо най-ниска антибактериална активност се установява за цяло растение мащерка.

В сравнение с останалите екстракти при тези от цяло растение за кориандър и джоджен стерилната зона е сравнима с екстрактите от корен – най-голяма зона на задържане спрямо екстрактите от листа и стъбло. Установява се, че стерилната зона при вариант декокт е по-голяма само при екстрактите от корен, при екстрактите от листа, стъбла и цяло растение е най-ниска.

При екстрактите от цяло растение за босилек и мащерка стерилните зони са сравними в по-голяма степен с тези от листа и стъбла. Концентрацията на всички части от растението (екстракти „цяло растение“) не повишава антимикробната активност за босилек и мащерка спрямо екстрактите с концентрация на определена част от растението (корени, листа, стъбла).

Като цяло всички варианти за лавандула и риган (цяло растение) имат по-силен антибактериален ефект срещу *Escherichia coli* спрямо същите варианти с корени, стъбла и листа (с изключение за медицинско масло лавандула – стъбла, корени и цяло растение имат еднакъв ефект, както и медицинско масло риган – листа и цяло растение имат еднакъв ефект).

По отношение на вариантите цяло растение за кориандър и джоджен стерилната зона намалява в следния ред: медицинско масло > медицински оцет > тинктура > медицинско вино > декокт.

По отношение на вариантите цяло растение за босилек и мащерка стерилната зона намалява в следния ред: медицински оцет > декокт > медицинско вино = медицинско масло > тинктура.

По отношение на вариантите цяло растение за риган и лавандула стерилните зони намаляват в следните редове: медицинско оцет > медицинско масло > декокт > медицинско вино > тинктура (риган);
медицинско оцет > декокт > тинктура > медицинско масло = медицинско вино (лавандула).

Антибактериалните активности на растенията при вариантите на 2-ри и 10-ти ден от приготвянето на извлеките са слабо по-ниски от тези на 20-ти ден, като тенденциите са сходни.

При комбинирането на вариантите между декокт и останалите варианти се запазва по-висока антибактериална активност при извлеките от корени на кориандър, джоджен и босилек. Най-висок е антибактериалния ефект при комбинирането на декокт с медицински оцет и медицинско масло, следва с тинктура, а най-ниска активност се установява при смесване на декокт с медицинско вино за растенията кориандър, джоджен, лавандула и риган. При босилек и мащерка се установява сравнително изравняване на антибактериалната активност между отделните комбинации. При мащерка антибактериалната активност на корените намалява и стерилните зони са по-близки при сравнение между отделните растителни части и цяло растение. При лавандула антибактериалният ефект е най-висок за цяло растение при всички комбинации. Най-висока антибактериална активност се установява за лавандула и риган при комбиниране на декокт с медицински оцет, както за цяло растение, така и за отделните растителни части. Устойчиво по-ниска за всички комбинации е антибактериалната активност при мащерка. При комбинирането на декокт с медицински оцет при риган – цяло растение, култивиране 48 ч. се регистрира най-висока антимикробна активност срещу *Escherichia coli*, по-висока с 0,2 cm спрямо същия вариант, но без комбинация с декокт. С удължаване времето на култивиране и периодът след смесване антибактериалната активност слабо се повишава (нарастване на стерилната зона основно с около 1 mm) или остава същата.

При комбинирането на вариант медицински оцет за три от растенията показващи най-висока антибактериална активност при този вариант – кориандър, лавандула и риган (20-ти ден от смесването) се установи повишаване на антибактериалната активност, достигаща до 1,7 cm стерилна зона за цели растения, при 48 ч. култивиране (табл. 8).

Таблица 8. Антибактериална активност при комбиниране на кориандър, лавандула и риган (медицински оцет, 20-ти ден, оранжерия)

Вариант	Растителна част	Стерилна зона, cm	
Час на култивиране:		24	48
Медицински оцет	Корени	1,5	1,6
	Листа	1,5	1,5
	Стъбла	1,5	1,5
	Цяло растение	1,6	1,7

Антибактериалните активности на растителните извлекци срещу *Escherichia coli* за вариантите от вегетационна клетка са по-високи спрямо тези получени от

оранжерийните растения, като тенденциите са сходни на описаните за вариантите от оранжерията (таблици 9 и 10).

Таблица 9. Антибактериална активност на извлекци от лавандула (клетка)

Вариант	Растителна част	Антибактериална активност (стерилна зона, cm)					
Дни след приготвяне:		2-ри ден		10-ти ден		20-ти ден	
Часове на култивиране:		24	48	24	48	24	48
Декокт	Корени	0,5	0,5	0,5	0,6	0,6	0,6
	Листа	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
	Стъбла	0,6	0,7	0,6	0,7	0,7	0,8
	Цяло растение	1,3	1,3	1,3	1,4	1,4	1,4
Тинктура	Корени	0,5	0,7	0,6	0,7	0,6	0,7
	Листа	0,4	0,5	0,4	0,5	0,4	0,5
	Стъбла	0,4	0,5	0,4	0,5	0,4	0,5
	Цяло растение	0,8	0,8	0,8	0,9	0,9	1,0
Медицински оцет	Корени	1,0	1,0	1,0	1,1	1,0	1,1
	Листа	1,1	1,2	1,2	1,3	1,3	1,4
	Стъбла	1,0	1,1	1,1	1,2	1,1	1,2
	Цяло растение	1,3	1,4	1,3	1,4	1,4	1,5
Медицинско вино	Корени	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	Листа	0,6	0,6	0,6	0,7	0,6	0,7
	Стъбла	0,5	0,6	0,5	0,6	0,5	0,6
	Цяло растение	0,6	0,7	0,6	0,7	0,7	0,8
Медицинско масло	Корени	0,6	0,7	0,7	0,7	0,7	0,8
	Листа	0,5	0,6	0,5	0,6	0,5	0,6
	Стъбла	0,6	0,7	0,7	0,8	0,7	0,8
	Цяло растение	0,6	0,7	0,6	0,7	0,7	0,7

Таблица 10. Антибактериална активност при комбиниране на кориандър, лавандула и риган (медицински оцет, 20-ти ден, оранжерия)

Вариант	Растителна част	Стерилна зона, cm	
Час на култивиране:		24	48
Медицински оцет	Корени	1,6	1,7
	Листа	1,6	1,7
	Стъбла	1,6	1,7
	Цяло растение	1,7	1,8

Допълнителните условия – намаляване на рН на средата при използване на медицински оцет и медицинско вино, включването на допълнителни растения – грозде (вино), оцет (ябълки, грозде), маслини (разтворител зехтин за медицинското масло) също оказват влияние върху зоната на задържане. При вариантите с медицински оцет се образува обща стерилна зона около ямките, при вариантите с медицинско вино – мехурчест ореол около ямките – вероятно реакции от по-кисела среда, влияние на разтворителя, вида растителност и други фактори. При вариантите с медицинско масло се увеличава стерилната зона към вътрешността, което показва засилен ефект от комбинирането на вариантите корен, листа, стъбла, цяло растение и комбинирането на екстрактите с екстракт от маслини (зехтин). С увеличаване на времето на действие на екстрактите (24h, 48h) нараства диаметъра на стерилната зона.

Очевидно разтворителят оказва влияние върху стерилната зона за различни растения. Медицинският оцет намалява рН на средата, което също оказва влияние за по-високия ефект на този вариант срещу *Escherichia coli*.

Получените до тук резултати са с количествен характер, по нататъчната тяхна статистическа обработка е предствен в Глава III.

III. СРАВНИТЕЛЕН АНАЛИЗ НА ВЛИЯНИЕТО НА СУРОВИННИТЕ И ТЕХНОЛОГИЧНИ ФАКТОРИ ВЪРХУ АНТИБАКТЕРИАЛНАТА АКТИВНОСТ НА ЕКСТРАКТИВНИ РАЗТВОРИ, КАТО ДОБАВКИ ЗА ОБЕЗЗАРАЗЯВАНЕ НА КОМПОСТ

3.1. Обща постановка

Следвайки целта на изследването и предварителните експериментални резултати е поставена задачата за оценка на ефективността на факторите, използвани като суровини и технологични основи на разтвори с антибактериално действие срещу *Escherichia coli*. Входящите фактори от суровинно-биологичен характер са използваните растителни видове (кориандър, босилек, риган, лавандула, мащерка и джоджен) и техните фракции (корен, стъбла, листа и цели растения). В групата на технологичните входящи фактори са включени средите и технологиите за получаване на екстрактивни разтвори (декок, тинктура, оцет, вино, масло).

Като изходна цел е определенето на условията и технологиите за получаване на краен продукт с възможно най-добро качество при наличие на ограничения от суровинен и технологичен характер. Без да навлизаме в биологичната или химическа същност на

задачата можем да приемем, че в общия случай става дума за една система за оптимално управление, чиято ефективност зависи от начина, мястото, технологията и продължителността на производствения процес.

3.2. Статистическа обработка на експерименталните данни

От гледна точка на ефективността на производствения технологичен процес за получаване на крайния продукт с гарантирано качество (антимикробна активност), определящи са условията за отглеждане на растенията, свеждащи се до:

- място на отглеждане-в оранжерия или във вегетационна клетка;
- момент на въвеждане на продукта-на 2, 10, 20 ден от приготвяне на извлеките и продължителност на култивиране 24 или 48 часа.

Предварителните анализи на експерименталния материал от тази гледна точка са основание да изследваме разпределението на антимикробната активност в три класа:

- екстракти от растения, отглеждани при специални условия във вегетационна клетка „еталон“;
- екстракти от растения, отглеждани в оранжерия на 20-тия ден от приготвяне на извлеките-клас, условно приет като „добър“;
- екстракти от оранжерийно отглеждани растения на втори и десети ден от приготвянето на извлеките-условно приет като „недобър“.

Тези съображения са отчетени при съставянето на структурната схема за решаване на задачата, която е представена на фиг. 31.



Фиг.31 Структурна схема на система за обработка на данни

След прилагане на процедурата за всеки растителен вид са представени резултатите за оценка на полезността (антибактериална активност), както следва:

- оценка на информационната полезност на всеки растителен вид;
- оценка на информационната полезност на отделните фракции на съответния растителен вид;
- оценка на информационната полезност на технологичните основи на извличане и приготвяне на разтвора.

В блока за статистическа обработка на експерименталните данни на фиг.31 са заложили процедури за пресмятане на първите начални и вторите централни моменти, като е предвидена възможност и за решаване на задачите за проверка на хипотезите или на класификация и разпознаване на състоянията по косвени признаци [27,28].

Целта на следващия анализ на резултатите е да бъдат проверени възможностите за решаване на проблема за намаляване на размерността на моделите за оценка на антибактериалната активност на факторите. Пълно решение на задачата за оценка на информационната ценност на входящите признаци (фактори) е предложено в [28]. Установено е, че в общия случай критерият за полезност, свързващ уловията за разделимост на състоянията с метричните свойства на факторното пространство приема формата на известното в теорията дисперсионно отношение на Фишер:

$$F = \frac{S_D^2}{S_R^2}, \text{ където}$$

S_D^2 -оценка на пофакторното разсейване (между групите на състоянията);

S_R^2 - остатъчна оценка на разсейването (в групите).

В едномерна двуалтернативна постановка при известни истински стойности на математическите очаквания на групите μ_1 и μ_2 и на общата съвкупност μ_0 и на дисперсията на сместа σ^2 , чувствителността може да бъде оценена количествено чрез т.н. „фактори на невярност на нулевата хипотеза“:

$$\varphi = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^k n_i (\mu_i - \mu_0)^2}{k \sigma^2}}, (i=1, 2) \quad (1)$$

Проведеният статистически анализ на този етап ни дава възможност да приемем хипотезите за различие между групите фактори в рамките на всеки от трите класа на състояние. По този начин задачата за оценка на антибактериалната активност са свежда до използването на шест модела, което е едно добро технологично решение от гледна точка на икономия на време и ресурс.

Втората част на изследването има за цел установяване на възможностите за решаване на друг общотехнологичен проблем, свързан с влиянието на мястото и продължителността на предварителните експерименти при получаване на краен продукт с висока антибактериална активност. Резултатите от проверката на хипотезите за всички фактори са представени в дисертацията в табличен (табл.83) и графичен (фиг.31) вид.

На база на проведения статистически анализ на антибактериална активност на екстрактивни разтвори с различни суровинни и технологични основи са формулирани следните изводи и препоръки за бъдеща бъдещо внедряване на резултатите в лабораторната и технологична практика:

1. Проведен е сравнителен анализ на информационната ценност на всички фактори, влияещи върху качеството на изходния продукт. С използване на методите за проверка на хипотези са определени най-значимите в информационно отношение групи от фактори по растителни видове, фракции и технологии на извличане. По този начин сложните многофакторни и многоцелеви процедури са доведени до малък брой модели (в случая шест) за планиране, експериментално изследване и производствени технологии за получаване на изходен продукт с най-добро качество. Това е едно добро общотехнологично решение от гледна точка на икономия на време и ресурси.

2. Доказаната статистическа идентичност на данните от класовете, приети като “еталонен” и “добър”, прави възможно отстраняването от общата производствена задача на експериментите и технологиите на класа с по-лоши показатели по време и ресурси. Този теоретичен резултат е основа на едно бъдещо технологично решение.

ОБОБЩЕНИЯ И ИЗВОДИ. НАУЧНО-ПРИЛОЖНИ И ПРИЛОЖНИ ПРИНОСИ

В заключение към дисертационния труд отбелязваме, че необходимостта за неговото разработване се свежда до констатираната тенденция за повишаване на теоретичните изследвания и практически опити за разработване на лекарствени средства от растителен произход. От началото на XXI век лекарствения пазар е зает с рекламни материали и търговски предложения, които под формата на хранителни лекарствени добавки често излиза извън строгите граници на медицинските и фармакологични стандарти. Забелязва се и тенденция за преобладаване на търговския интерес над научните изследвания и разумните приложни технологии. В научните приложения за изследване на различни растителни екстракти също се забелязват неточности и непълноти, засягащи таксономичната номенклатура, ботаническото удостоверяване и

произхода на ботаническия материал. С не по-малко значение е и липсата на стандарни методи за оценка на антибактериалната активност на растителния материал и технологиите за извличане на основите на екстрактивните разтвори срещу конкретни патогени. Каа бъдеща положителна тенденция отбелязваме, че колоборацията и сътрудничеството между различните институции и научни среди, както и добрата комуникация с бизнес операторите могат да бъдат добра основа за изследване на биоразнообразието. Научните проекти и патентни политики и образованието съгласно принципите на конвенцията на ООН за биологичното разнообразие и протокола от Нагоя (ООН 2011г.).

За решаването на тези задачи е необходимо преодоляване на разнообразието в подходите и въвеждането на единен общ подход, ред и начин на комуникиране. Паради това, следвайки наименованието и целите на дисертационния труд беше направен опит за въвеждане на ред в научната и приложна дейност с използването на сисемен подход. В процеса на решаването на тези задачи следва да се търсят приносите в дисертационния труд, които се разделят в две групи:

I. Научно-приложни приноси, свеждащи се до получаване на нови и потвърдителни факти и доказване на нови страни на съществуващи методи с помощта на известни методи и модернизирани технологии

1.1. Разработени са обща система и структурна схема за сравнителен анализ на влиянието на суровинните и технологични фактори върху антибактериалната активност на екстрактивни разтвори, като добавки за обеззаразяване на компост.

1.2. Предложен е критерий и е разработена методика за намаляване на размерността на моделите за оценка на антибактериалната активност на разтвори с различна суровинна и технологична основа. Критерият за полезност се основава на известното в теорията дисперсно отношение на Фишер и свързва условията за разделимост на състоянията с метричните свойства на факторното пространство.

1.3. Разработена е методика за сравнителна оценка на качеството на крайния продукт, изработен по данни и технологии в три различни класа според начина на отглеждане на първичния експериментален материал. Методиката се основава на комплексна проверка на хипотези за принадлежност на всички фактори към всеки от разглежданите класове на състояние и с помощта на методиката се доказват статистическите идентичности и статистическите различия между сравняваните класове на състоянието. По този начин сложните многофакторни и многоцелеви процедури се преобразуват до малък брой модели за планиране експериментално изследване и производствени технологии за получаване на изходен проект с най-добро качество.

1.4. Разработен и апробиран е комплексен модел за изследване на антимикробни свойства на етерично-маслени култури, отглеждани в различни култивационни съоръжения, включващи условия на отглеждане на растителните видове и фракции, техника и технологии за приготвяне на растителните извлеци и разтвори, методи за почвен агрохимичен анализ, методи и техники за определяне на биогенност на растителните извлеци и за антимикробна активност, методика и резултати за статистически анализ, с което се поставят основите на системния подход за решаване на този сложен комплекс от задачи.

II. Приложни приноси, свеждащи се до получаване на конкретни резултати за внедряване в практиката

2.1.Получени са конкретни резултати от агрохимични почвени анализи в оранжерийни условия и във вегетационна клетка на шест растителни вида.

2.2.Получени са конкретни резултати от микробиологични и ензимни почвени анализи без растителност и шест растителни вида в края на вегетацията за двата варианта на култивиране-в оранжерийни условия и във вегетационна клетка.

2.3. Получени са конкретни резултати от изследване на микрофлората на растителните извлеци. Биогенността на растителните извлеци е представена чрез изследване на неспорообразуващи бактерии -бацили, актиномицети,микримицети и плесенни гъби, на 2-ри, 10-ти и 20-ти ден от приготвяне на извлеците, при отглежданията на растенията в оранжерийни условия и във вегетационна клетка.

2.4. Получени са конкретни резултатаи за качеството на крайния продукт, разработен по данни и технологии в три различни класа според начина на отглеждане на първичния експериментален материал. Резултатите от статистическия анализ дават възможност за приемане на хипотезите за различие между групите фактори в рамките на всеки от трите класа на състояние (еталон, добър и недобър). С включване на най-добрите групи от фактори е доказана възможността за съществено намаление на броя и сложността на моделите за оценка на антибактериалната активността на екстрактивните разтвори.

2.5.С използване на методиката за сравнителна оценка на качеството на крайния продукт са доказани статистическата идентичност на данните, от класовете, приети като еталонен и добър и на статистическите им различия от класа, приет като недобър (оранжерийни условия на 2-ри и 10-ти ден от приготвянето на извлеците).

2.6. Установена е антибактериална активност срещу *Escherichia coli* на извлеките от фракции на кориандър, босилек, риган, лавандула, мащерка и джоджен в намаляващ порядък.

Показателите на степента на полезност (антибактериална активност) на всеки от факторите се пресмятат по данни с обем:

-антибактериална активност на растителния вид по 120 наблюдения на фактор (растителен вид);

-антибактериална активност на растителните фракции от изследвания растителен вид по 30 наблюдения на фракция;

-антибактериална активност на разтворите, основаващи се на конкретния растителен вид по 24 наблюдения на метод.

С отчитане на броя на растителните видове ($n=6$) и класовете ($n=3$) се получава общ обем на данните $n=2160$. Това е една представителна статистика, която може да се използва за решаването на по-сложни процедури (например класификация и разпознаване на състоянията).

Получените 180 частни модела за оценка на антибактериалната активност са обобщени след осредняване в три групи, както следва:

-B'- обобщени антибактериални активности в три класа, приети като еталонен

(B1)'-за растителните видове

(B2)'-за технологичните основи при получаване на разтворите

(B3) '-за използваните фракции на растителния вид

-B''-обобщени антибактериални активности в класа, приет като „добър“

(B1) ''-за растителните видове

(B2) ''-за технологичните основи

(B3) ''-за растителните фракции

-B'''-обобщени антибактериални активности в класа, приет като „недобър“

(B1) '''-за растителните видове

(B2) '''-за технологичните основи

(B3) '''-за растителните фракции

Публикации по дисертационния труд

1. Boyka Malcheva, Pavlina Naskova, Bilyana Grigorova-Pesheva, Dragomir Plamenov, Milena Yordanova, Alexandrina Kostadinova-Slaveva, Dijana Blazhekovikj-Dimovska, **Dimitar Nikolov**. (2024). Investigation of *Lavandula angustifolia* Mill. extracts as anti-*Escherichia coli* agents and microbial additives: are they an alternative to enrichment, decontaminating and deodorizing agents for organic soil improvers? Soil science annual 2024, 75(1), 186455. (Scopus, Web of science).

2. Naskova P., Malcheva B., Plamenov D., **Nikolov D.** (2023). Effect of coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil culture on soil biogenicity and determination of its antimicrobial activity against *Escherichia coli*. Scientific Papers. Series A. Agronomy, Vol. LXVI, No. 1, 2023 ISSN 2285-5785; ISSN CD-ROM 2285-5793; ISSN Online 2285-5807; ISSN-L 2285-5785 (Web of science).

3. Malcheva B., Naskova P., Plamenov D., **Nikolov D.** (2023). Influence of essential oil spearmint (*Mentha spicata* L.) culture on soil biogenicity and determination of its antimicrobial activity against *Escherichia coli*. Scientific Papers. Series B, Horticulture. Vol. LXVII, No. 2, 2023 Print ISSN 2285-5653, CD-ROM ISSN 2285-5661, Online ISSN 2286-1580, ISSN-L 2285-5653 (Web of science).

4. Boyka Malcheva, Pavlina NASKOVA, Bilyana GRIGOROVA-PESHEVA, Dragomir PLAMENOV, Dijana BLAZHEKOVIKJ-DIMOVSKA, **Dimitar NIKOLOV**, Rozalina KOLEVA. Antibacterial Activity of Ocimum Basilicum L. and Thymus Vulgaris L. Extracts against Escherichia coli as a future method for decontamination and deodorization of compost-like mixtures. Edelweiss Applied Science and Technology ISSN: 2576-8484 Vol. 8, No. 6, 2072-2084 2024 Publisher: Learning Gate DOI: 10.55214/25768484.v8i6.2390

5. **Николов. Д.** (2024). Неоткрития потенциал на растителните екстракти. Списание за наука „Ново знание“ Vol 13, No 1 (2024). ISSN 2367-4598 (Online)