

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.807>

<https://orcid.org/0000-0003-0663-2247>

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Raimonda Mažylytė

Dirvožemio mikrobiomo sudėties ir funkcionalumo įtaka augalų vegetaciniam procesams

DAKTARO DISERTACIJA

Gamtos mokslai,
Biologija (N 010)

VILNIUS 2025

Disertacija rengta 2020–2024 metais Vilniaus universitete, Gyvybės mokslų centre.

Moksliniai vadovai:

Prof. dr. Eglė Lastauskienė (Vilniaus universitetas, Gyvybės mokslų centras, gamtos mokslai, biologija, N 010; laikotarpis nuo 2020-10-01 iki 2022-09-30).

Doc. dr. Audrius Gegeckas (Vilniaus universitetas, Gyvybės mokslų centras, gamtos mokslai, biologija, N 010; laikotarpis nuo 2022-10-01 iki 2024-09-30).

Gynimo taryba:

Pirmininkas:

Doc. dr. Raimondas Šiukšta (Vilniaus universitetas, Gyvybės mokslų centras, gamtos mokslai, biologija, N 010).

Nariai:

Dr. Daiva Burokienė (Valstybinis mokslinių tyrimų institutas, Gamtos tyrimų centras, gamtos mokslai, biologija, N 010);

Dr. Dukas Jurėnas (Briuselio laisvasis universitetas, Belgija, gamtos mokslai, biochemija, N 004);

Dr. Vida Časaitė (Vilniaus universitetas, Gyvybės mokslų centras, gamtos mokslai, biologija, N 010);

Prof. dr. Vytautas Liakas (Vytauto Didžiojo universitetas, žemės ūkio mokslai, agronomija, A 001).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2025 m. rugpjūčio mėn. 29 d. 13:00 val. Vilniaus universiteto, Gyvybės mokslų centro R401 auditorijoje. Adresas: Saulėtekio al. 7, Vilnius, Lietuva.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje ir Vilniaus universiteto interneto svetainėje adresu: <https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.807>

<https://orcid.org/0000-0003-0663-2247>

VILNIUS UNIVERSITY

Raimonda Mažylytė

Influence of soil microbiome composition and functionality on plants vegetative processes

DOCTORAL DISSERTATION

Natural Sciences,
Biology (N 010)

VILNIUS 2025

The dissertation was prepared between 2020 and 2024 at Vilnius University, Life Sciences Center.

Academic supervisors:

Prof. dr. Eglė Lastauskienė (Vilnius University, Life Science Center, Natural Sciences, Biology, N 010; period between 01/10/2020 and 30/09/2022).

Doc. dr. Audrius Gegeckas (Vilnius University, Life Science Center, Natural Sciences, Biology, N 010; period between 01/10/2022 and 30/09/2024).

This doctoral dissertation will be defended in a public meeting of the Dissertation Defence Panel:

Chairman:

Doc. dr. Raimondas Šiukšta (Vilnius University, Life Science Center, Natural Sciences, Biology, N 010).

Members:

Dr. Daiva Burokienė (State Scientific Research Institute, Nature Research Centre, Natural Sciences, Biology, N 010);

Dr. Dukas Jurėnas (Université Libre de Bruxelles, Belgium, Natural Sciences, Biochemistry, N 004);

Dr. Vida Časaitė (Vilnius University, Life Science Center, Natural Sciences, Biology, N 010);

Prof. dr. Vytautas Liakas (Vytautas Magnus University, Agricultural Science, Agronomy, A 001).

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 13:00 on 29th August 2025 in Auditorium R401 of the of the Life Sciences Center.

Address: Saulėtekio al. 7, Vilnius, Lithuania

The text of this dissertation can be accessed at the libraries of Vilnius University, as well as on the website of Vilnius University:

www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

TURINYS

SANTRUMPOS	8
IVADAS.....	9
MOKSLINIS NAUJUMAS	12
1. LITERATŪROS APŽVALGA	14
1.1. Tvaraus žemės ūkio reikšmė pasaulyje	14
1.2. Mikroorganizmų ir augalų tarpusavio sąveikos	17
1.3. Sintetinių mikroorganizmų bendruomenių reikšmė žemės ūkyje	19
1.4. Fosforas žemės ūkyje ir jo reikšmė augalų vegetacijos procesams.....	22
1.5. Svarbiausi veiksniai, turintys įtakos mikroorganizmų kultivavimui ir metabolitų susidarymui	28
1.6. Mikroorganizmų ląstelių produkuojami metabolitai, jų skirstymas ir funkcijos.....	31
1.7. Augalų hormonų sintezė ir reguliacijos keliai naudojant augalų augimą skatinančius mikroorganizmus	35
1.8. Veiksniai, turintys įtakos mikrobiologinių preparatų panaudojimo sėkmei tvariame žemės ūkyje	38
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	42
2.1. Medžiagos	42
2.1.1. Reagentai, tirpalai ir substratai	42
2.1.2. Biologinės kilmės medžiagos	42
2.2. Metodai.....	43
2.2.1. Birus dirvožemio ir rizosferinio dirvožemio mėginių surinkimas....	43
2.2.2. Agrocheminė dirvožemio mėginių analizė.....	45
2.2.3. Augalų augimą skatinančių mikroorganizmų izoliacija	46
2.2.4. Mikroorganizmų molekulinis identifikavimas ir filogenetinė analizė	47
2.2.5. ZymoBIOMICS® tikslinis sekos nustatymas	48
2.2.6. Izoliuotų mikroorganizmų kamienų charakterizavimas	49
2.2.6.1. Amonjako (NH ₃) išskyrimo nustatymas.....	49
2.2.6.2. Vandens cianido (HCN) gamybos nustatymas	49

2.2.6.3. Sideroforų gamybos nustatymas.....	50
2.2.6.4. 1-aminociklopropan-1-karboksilato (ACC) deaminazės gamybos nustatymas	50
2.2.6.5. Katalazės aktyvumo nustatymas.....	51
2.2.6.6. Azoto fiksavimo aktyvumo nustatymas	51
2.2.6.7. Kalio junginių tirpinimo efektyvumo nustatymas.....	52
2.2.6.8. Fosfatinų junginių tirpinimo efektyvumo nustatymas.....	52
2.3. Kiekybinis fosfatų tirpinimo aktyvumo įvertinimas.....	52
2.4. Mitybinės terpės maistinių medžiagų sudėties ir kontroliuojamų augimo parametrų optimizavimas	53
2.5. Biologinių fermentacijos procesų optimizavimas	54
2.6. Organinių rūgščių analizė naudojant skysčių chromatografiją-masių spektrometrija (LC-TOF/MS)	55
2.7. Fitohormonų analizė naudojant skysčių chromatografiją-masių spektrometrija (LC-TOF/MS)	56
2.8. Bendros inokuliacijos bandymas nesteriliomis sąlygomis	57
2.9. Statistinė analizė.....	58
3. REZULTATAI	59
3.1. Eksperimentinių plotų analizė ir meteorologinės sąlygos	59
3.2. Mikroorganizmų izoliavimas, molekulinis identifikavimas ir filogenetinė analizė.....	64
3.3. Bakterijų mikrobiotos sudėties analizė rizosferiniuose dirvožemio mėginiuose	72
3.4. Mikroorganizmų charakterizavimas ir atranka.....	81
3.4.1. Bendras mikroorganizmų charakterizavimas	81
3.4.2. Mikroorganizmų gebėjimas tirpinti netirpų akmens fosfatą ir organinių rūgščių analizė.....	85
3.5. Mitybinės terpės sudėties bei augimo sąlygų optimizavimas laboratorinio lygio EDF 5.4_1 bioreaktoriuose	93
3.6. Mikroorganizmų inokuliacijos poveikis <i>Z. mays</i> , <i>P. vulgaris</i> ir <i>T. aestivum</i> augalų kultūroms.....	103
4. REZULTATŲ APTARIMAS.....	108

IŠVADOS.....	122
SUMMARY OF DOCTORAL DISSERTATION	123
PADĒKA.....	165
PUBLIKACIJŲ SĀRAŠAS	166
KONFERENCIJŲ SĀRAŠAS	167
CURRICULUM VITAE (CV)	169
LITERATŪROS SĀRAŠAS.....	170
UŽRAŠAMS	194

SANTRUMPOS

AASM – augalų augimą skatinantys mikroorganizmai;

aps./min – apsisukimai per minutę;

ANOVA – dispersinės analizės metodas (angl. *Analysis of Variance*);

BLAST – palyginių paieškos programa (angl. *Basic Local Alignment Search Tool*);

BLASTn – nukleotidų sekų palyginių paieškos programa (angl. *Nucleotide BLAST*);

bp – bazių pora;

KFV – koloniją formuojantis vienetas (angl. *Colony Forming Unit*);

HPLC-MS – didelio našumo skysčių chromatografija su masių spektrometrija (angl. *High Performance Liquid Chromatography with Mass Spectrometry*);

LB – lizogeninis sultinys (angl. *Lysogeny Broth*);

LC – skysčių chromatografija (angl. *Liquid Chromatography*);

MF – gamtinis fosforitas iš Maroko;

m/v – masės/tūrio santykis;

m/z – masės/krūvio santykis;

NCBI – nacionalinis biotechnologijos informacijos centras (angl. *National Center for Biotechnology Information*);

OT – optinis tankis;

PGR – polimerazės grandininė reakcija;

v/v – tūris tūryje;

SynComs – sintetinės bendruomenės (angl. *Synthetic Communities*);

SKN – standartinė klimato norma;

WHO – pasaulinė sveikatos organizacija (angl. *World Health Organization*).

IVADAS

Svarbiausias žemės ūkio sektoriaus uždavinys yra padidinti žemės ūkio augalų derlių ir ateityje patenkinti išaugusius gyventojų maisto poreikius [1]. Norint įveikti šį uždavinį reikia sutelkti didelį dėmesį į dirvožemio biologinę įvairovę ir agroekosistemą tam, kad būtų galima geriau suprasti sudėtingus procesus ir jų sąveiką valdant žemės ūkio mechanizmus [2]. Darnus žemės ūkis yra gyvybiškai svarbus šiuolaikiniame žmonių gyvenime. Dėl vis didėjančios žmonių populiacijos jis suteikia galimybę patenkinti išaugusius žemės ūkio poreikius, o taip pat tausoti, saugoti, pagerinti aplinką ir gamtinius išteklius bei prisideda prie ekonominės ir socialinės plėtros [3,4].

Dirvožemio derlingumas ir žemės ūkio produkcijos kiekis labai priklauso nuo to, kokios augalų apsaugos ir augimo stimuliavimą skatinančios priemonės yra naudojamos [5]. Pagal Jungtinių Tautų maisto ir žemės ūkio organizacijos duomenis (angl. *United Nations Food and Agriculture Organization, FAO*), kuri yra viena didžiausių specializuotų organizacijų Jungtinių Tautų sistemoje ir jos darbe dalyvauja 194 pasaulio šalys, nenaudojant augalų apsaugos priemonių kasmet pasaulyje nuo įvairių augalų ligų, kenkėjų ir piktžolių žemės ūkio produkcijos nuostoliai siektų 50 % ar net daugiau [6]. Tuo tarpu biologinės kilmės augalų apsaugą ir augimą stimuliuojančių priemonių naudojimas įrodytas gausiais moksliniais tyrimais, kuriais siekiama gauti ne tik didesnę žemės ūkio augalų derlių, bet ir daryti kuo mažesnę neigiamą poveikį aplinkai [7].

Pastaraisiais metais visame pasaulyje fiksuojamas dirvožemio derlingumo sumažėjimas. Dirvožemio degradacija visų pirma vyksta dėl tiesioginio žmonių įsikišimo: žemės dirbimo, cheminių trąšų ir pesticidų naudojimo, kitos socialinės ir ūkinės veiklos [8]. Pagrindiniai dirvožemio derlingumą mažinantys veiksniai – globalinė klimato kaita, temperatūros kilimas, besikeičiantis dirvos drėgnis bei vandens trūkumas, spartus augalo vystymuisi prieinamų organinių ir mineralinių medžiagų mažėjimas. Pati svarbiausia sveiko, derlingo ir našaus dirvožemio grandis – mikroorganizmai, kurie yra būtini maistinių medžiagų ciklui ir derlingumui palaikyti [9]. Atliekama daugybė įvairių tyrimų ieškant optimalių būdų, kurie leistų sukomponuoti tinkamą dirvožemio mikrobiotos sudėtį ir funkcionalumą augalų vegetaciniams procesams [10]. Pasaulyje komerciniai mikrobiologiniai preparatai žemės ūkio rinkoje atsirado prieš maždaug 120 metų, tačiau tik pastaruosius dešimtmečius sulaukė ypatingo dėmesio [11].

Kouchebagh ir kt. 2012 metais atliktas tyrimas parodė, jog kukurūzų derliui kaip mikrobiologinis produktas buvo išbandyti *Pseudomonas*, *Azospirillum* ir *Azotobacter* genčių mikroorganizmai. Gauti rezultatai parodė, jog kukurūzų lapuose padidėjo chlorofilo kiekis, kurį galėjo sąlygoti

mikroorganizmų gebėjimas išlaisvinti maistines medžiagas į augalams prieinamas formas. Tai savo ruožtu lėmė geresnį augalų augimą, padidino lapų plotą bei fotosintezės procesą. Taip pat nemažai mokslininkų patvirtino apie teigiamą sėklų, užkrėstų šiomis bakterijų kultūromis poveikį kukurūzų derliui [12].

Jakienė ir kt. 2015 metais aprašė biologinių preparatų, tokių kaip „Azofit“, „Nagro“, „Bioplant Flora“ ir „Raskila“ įtaką „Ernestina“ veislės cukrinių runkelių produktyvumui. Buvo nustatyta, kad naudojant mikrobiologinius preparatus pagerėjo ne tik dirvožemio būklė, bet padidėjo ir cukrinių runkelių derlingumas, šakniavaisių cukraus kiekis [13]. Sinkevičienė ir kt. 2018 metais tyrinėjo biologinės trąšos „Fitokondi“ poveikį ekologiškai augintų bulvių ligoms. Tyrimo metu pastebėta, jog vegetacijos metu nustatyta mažiau maro (lot. *Phytophthora infestans*) ir sausligės (lot. *Alternaria solani*) pažeistų augalų, o maro pažeidimų bulvių gumbuose visai nerasta [14]. Pastaruoju metu didelio susidomėjimo sulaukia mikroorganizmai gebantys skaidyti įvairius augalų likučius, tokius kaip nukritę augalų lapai, šiaudai ar smulkios durpės savo sudėtyje turinčios daug celiuliozės, kuri pagerina dirvožemio struktūrą. Gaidė ir kt. 2019 metais aprašė tyrimą, kurio metu iš dirvožemio izoliavo celiuliazes produkuojančius mikroorganizmus. Nustatyta, jog *Bacillus subtilis* DSM 1088 skatina celiuliozės irimą iki gliukozės, kuri naudojama kaip energijos ir anglies šaltinis biosferos procesuose, o tai įrodo, kad mikroorganizmai dalyvauja įvairiuose aplinkos procesuose [15].

Atsižvelgiant į mokslinius tyrimus ir pastaruoju metu sparčiai vystantis biotechnologijoms, degraduojančiam dirvožemiui atkurti vis dažniau į pagalbą pasitelkiami mikrobiologiniai metodai. Vieni iš svarbiausių atradimų yra mikroorganizmų įvedimas į dirvožemį ar įvairias augalo dalis [16]. Mikrobiologinių produktų sudėtyje yra natūralios kilmės medžiagų ir naudingų mikroorganizmų, kuriuos galima naudoti siekiant aktyvinti sėklas, augalus ar dirvožemį. Su mikrobiologiniais preparatais į dirvožemį patekę gyvybingi mikroorganizmai dauginasi ir taip užima pagrindinę ekologinę nišą, neleiddami dominuoti kenksmingiems ligas sukeliantiems mikroorganizmams [17]. Augalams naudojami bioproduktai pagerina augalų mitybos efektyvumą, sukelia gyvybinių ir struktūrinių procesų pokyčius siekdami paveikti augalų augimą, pagerina abiotinių ir biotinių stresų toleravimą ir padidina produktų derlių bei kokybę [18]. Siekiant pagerinti dirvožemio našumą bei augalų derlingumą pasaulio mokslininkų bei žemės ūkio sektoriaus darbuotojų dėmesys buvo sutelktas į naujas biotechnologijas bei įvairių inovatyvių bioproduktų kūrimą.

Darbo tikslas:

Sukurti žemės ūkio augalų kultūrų mikrobiologinio produkto prototipą(-us), skatinančius augalų vegetacijos procesus.

Darbo uždaviniai:

1. Nustatyti skirtingų žemės ūkio augalų kultūrų rizosferinių dirvožemių mikrobiotos santykinio gausumo rodiklius;
2. Izoliuoti ir identifikuoti tikslinius mikroorganizmus, pasižyminčius augalų augimą skatinančiomis savybėmis;
3. Optimizuoti atrinktų mikroorganizmų ar jų mišinių mitybinės terpės sudėtį ir kontroliuojamus augimo parametrus atliekant fermentacijos procesus 5,4 L laboratorinio tūrio bioreaktoriuose (EDF 5.4_1);
4. Įvertinti mikroorganizmų gebėjimą išskirti bioaktyvius junginius bei šių mikroorganizmų inokuliavimo poveikį augalų vegetaciniams procesams.

MOKSLINIS NAUJUMAS

Šiuo metu pasaulyje ypač didelis dėmesys yra skiriamas ekologiniams žemės ūkiams. Jis vertinamas kaip perspektyvi tradicinio žemės ūkio alternatyva. Šio tipo žemės ūkyje naudojama speciali žemdirbystės technika, kurios metu auginimo technologijoje cheminės ir mineralinės trąšos yra pakeičiamos įvedus mikrobiologinius preparatus, į kurių sudėtį įeina nepatogeniniai mikroorganizmai, įvairūs fermentai ar kitos biologiškai aktyvios ir augalų vegetacijai reikalingos medžiagos. Mikrobiologinių trąšų nauda augalams ir dirvožemiui yra pagrįsta papildomų mikroorganizmų įnešimu į dirvą padidinant dirvožemio mikrobiologinę įvairovę ir skatinant natūraliai jame vykstančius procesus [19]. Mikroorganizmų populiacija dirvožemyje yra svarbi pagrindiniams procesams, skatinantiems agrarinių ekosistemų stabilumą ir produktyvumą.

Šio projekto metu sukurtas inovatyvus bioproducto prototipas, skirtas augalų vegetaciniams procesams gerinti. Jo sudėtyje derinami iš įvairių skirtingų žemės ūkio augalų šaknų rizosferos izoliuoti ir atrinkti mikroorganizmai, išskiriantys biologiškai aktyvius junginius, kurie skatina augalų vegetacijos procesus. Mokslinio projekto metu nustatyta geriausiai suderinamų atrinktų mikroorganizmų kompozicija, kuri geba suteikti augalams efektyvų aprūpinimą maisto medžiagomis ir atsparumą abiotiniams ir biotiniams stresams. Taip pat sukurti laboratorinio lygio fermentacijos procesai, kurių metų vienoje aplinkoje kultivuojamos kelios skirtingos bakterijų gentys, o tokie gauti rezultatai ateityje gali būti pritaikyti didelio masto pramoniniuose fermentacijos procesuose. Fermentacijos procesų metu sukomponuoti biopreparatai *Priestia* sp. IIIDEG4, *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 + *Priestia* sp. IIIDEG93 ir *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91 nustatyti kaip konkurencingi mikrobiologiniai produktai, pasižymintys unikaliomis savybėmis ir efektyviu pritaikomumu žemės ūkyje.

Atsižvelgiant į gautus mokslinio projekto tyrimo rezultatus bus galima geriau suprasti mikroorganizmų naudą žemės ūkio sektoriuje. Konkrečių mikroorganizmų izoliacija ir pritaikymas tam tikroms augalų kultūroms yra daug laiko ir įvairių analizų reikalaujantis darbas bei šių dienų naujovė. Šio darbo metu nustatyta perspektyviausia dirvožemio ir pasėlių inokuliavimo mikroorganizmais strategija, kuri leidžia pagerinti augalų vegetaciją ir taip sumažinti cheminių ir mineralinių trąšų, darančių neigiamą poveikį aplinkai, naudojimą, o tuo pačiu yra nesudėtingas, ekonomiškai ir aplinką tausojantis procesas.

Ginamieji teiginiai:

1. *Actinomycetota*, *Pseudomonadota* ir *Bacillota* bakterijų tipai yra labiausiai dominuojantys rizosferiniuose dirvožemiuose *Z. mays*, *P. vulgaris* ir *T. aestivum* augalų kultūrose.
2. Dviejų ar trijų skirtingiems bakteriniams tipams priklausančių izoliuotų mikroorganizmų mišinys gali veikti sinergiškai ir lemti geresnes netirpių fosfatinių junginių tirpinimo savybes bei didesnes organinių rūgščių koncentracijas.
3. *Priestia* sp. IIIDEG4, *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 + *Priestia* sp. IIIDEG93 ir *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91 geba vykdyti augalų hormonų sintezę.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Tvaraus žemės ūkio reikšmė pasaulyje

Vienas iš reikšmingiausių ir svarbiausių sektorių pasauliniame kontekste yra žemės ūkis. Žemės ūkis – tai žemės dirbimas, gyvulių auginimas, maisto, pluoštų ir kitų produktų gamyba žmonių poreikiams tenkinti. Tai viena seniausių ir svarbiausių žmogaus veiklos rūšių, nes ji sudaro pagrindą aprūpinti žmoniją maistu, skatina ekonominę plėtrą ir yra tvarus pragyvenimo šaltinis milijonams žmonių visame pasaulyje. Žemės ūkio šaknys siekia tūkstančius metų, o jo plėtra pakeitė žmonių gyvenimą ir atvėrė kelią miestams bei civilizacijoms augti. Per pastarąjį šimtmetį pasaulis susidūrė su dideliu žmonių populiacijos augimu, o šis spartus gyventojų skaičiaus augimas sudarė didelį spaudimą žemės ūkiui ir jo išauginamai produkcijai. Šiandien ūkininkavimas tebėra viena iš būtiniausių ir svarbiausių ekonomikos grandinių [20].

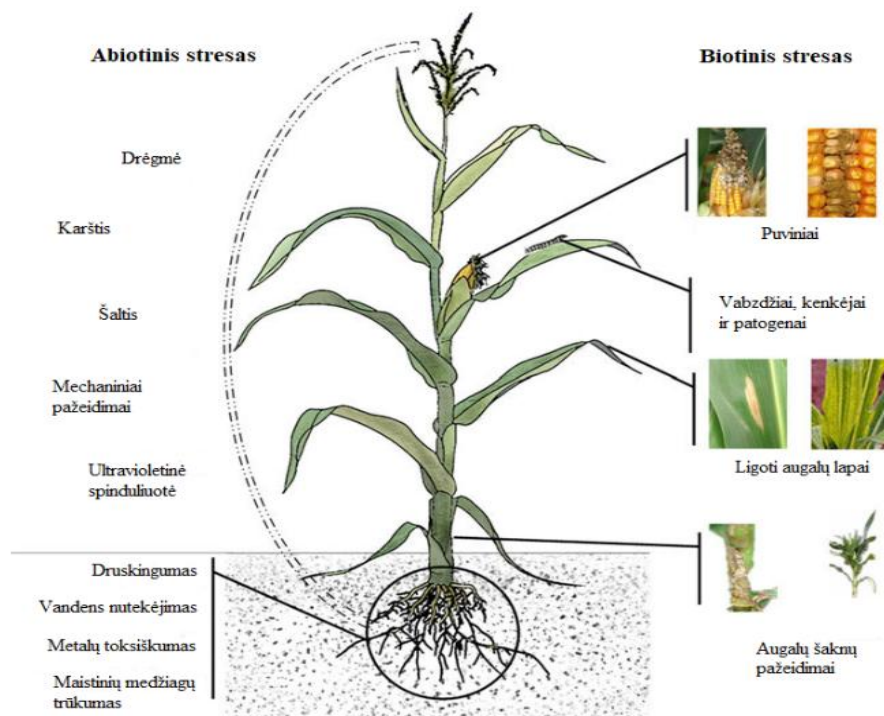
Dirvožemio derlingumas ir žemės ūkio produkcijos kiekis labai priklauso nuo to, kokios augalų apsaugos ir augimo stimuliavimą skatinančios priemonės yra naudojamos. Didžioji dalis žemės ūkyje naudojamų cheminių ir mineralinių augalų trąšų veikia ne tik patogeninius mikroorganizmus ir tiekia augalui mineralines medžiagas, bet gali daryti neigiamą poveikį aplinkai bei žmonių sveikatai [21]. Todėl labai svarbu, kad jų naudojimas būtų reglamentuotas ir ekonomiškai pagrįstas. Tuo tarpu naudojant augalų augimą stimuliuojančias priemones siekiama gauti ne tik didelį žemės ūkio augalų derlių, bet ir daryti kuo mažesnę žalingą poveikį aplinkai [22, 23].

Sunku glaustai apibrėžti tvaraus žemės ūkio sąvoką, nes tvarumas apima daugybę aspektų. Tačiau Pasaulinės aplinkos ir plėtros komisijos (angl. *World Commission on Environment and Development*) 1987 m. Brundtlando ataskaitoje „Mūsų bendra ateitis“ (angl. *Our Common Future*) tvarus vystymasis pirmą kartą apibrėžtas kaip „vystymasis, kuris patenkina dabartinės kartos poreikius, tuo pačiu nepablogindamas gyvenimo sąlygų ateities kartoms“ [24]. Pagrindiniai tvaraus žemės ūkio bruožai yra ūkininkavimas taip, kad būtų gerai valdomos gamtos sistemos ir ištekliai, o tai apima sveiko dirvožemio kūrimą ir erozijos prevenciją, efektyvius ir tvarius vandens išsaugojimo metodus, oro ir vandens taršos mažinimą, anglies kaupimą dirvožemyje ir (arba) augalinėje medžiagoje, augalų atsparumo ekstremalioms oro sąlygoms didinimą ir biologinės įvairovės skatinimą. Taip pat įvairios žemėtvarkos praktikos gali prisidėti prie tvaraus žemės ūkio, o tai ypač apima ir sėjomainą bei augalininkystės įvairovę, įskaitant tarpinių auginimą ir daugiametę sėjomainą [25].

Siekiant didesnio žemės ūkio tvarumo skatinama taikyti agroekologinius principus pritaikytus biologinėje ar ekologinėje žemdirbystėje. Ekologinėje žemdirbystėje vengiama sintetinių trąšų ir cheminių priedų, tokių kaip pesticidai, naudojimo, kartu skatinant sėjomainą, daugiausia dėmesio skiriant dirvožemio derlingumo palaikymui ir uždariems maistinių medžiagų ciklams. Tačiau nepaisant įrodytų ekologinio ūkininkavimo pranašumų, pagal Tarptautinės ekologinės žemdirbystės judėjimo federacijos duomenis (angl. *International Federation of Organic Agriculture Movements, IFOAM*) sertifikuotas ekologinis ūkininkavimas užima tik apie 7 % pasaulio ariamos žemės (96 mln. ha) ir 4,5 mln. ekologinių gamintojų iš dalies todėl, kad jis įprastai duoda mažesnę derlių nei įprastinė žemės ūkininkavimo praktika [26]. Pagal Jungtinių Tautų (angl. *United Nations, UN*) prognozuojamus duomenis tam, kad ekologinės sistemos būtų plačiai pritaikytos reikėtų įdirbti daugiau žemės norint iki 2100 m. išmaitinti 2 mlrd. išaugusią planetos žmonių populiaciją. Taip pat Jungtinių Tautų 70-ojoje sesijoje 2015 m. priimta Generalinės Asamblėjos rezoliucija, kurioje paskelbta 17 pasaulio darnaus vystymosi tikslų (DVT17) ir 169 uždaviniai, kurių vienas iš pagrindinių tikslų yra iki 2030 m. pasiekti tvarų vystymąsi, užtikrinant socialinį, ekonominį ir aplinkosauginį tvarumą visame pasaulyje. Antrasis Jungtinių Tautų Darnaus Vystymosi Tikslų (angl. *United Nations Sustainable Development Goals, SDGs*) yra panaikinti bada, užtikrinti žmonijos aprūpinimą maistu ir geresnę mitybą bei skatinti tvarų žemės ūkį [27]. Tačiau žemės ūkis, kaip pasaulinės maisto gamybos pagrindas, XXI amžiuje susiduria su daugybe iššūkių. Greitai kintantis planetos klimatas, pasižymintis sunkesniais ir vis nenuspėjamesniais orų modeliais, kelia didelę grėsmę žemės ūkio derliui. Išaugęs poreikis maitinti vis labiau augančią populiaciją kartu su susirūpinimu dėl aplinkos tvarumo paskatino pereiti prie kitokių ūkininkavimo praktikų ir ieškoti alternatyvų tradiciniam žemės ūkiui. Tradiciniai metodai, žinomi dėl intensyvaus cheminių medžiagų naudojimo pasėliams ir augalų kultūros, buvo tikrinami dėl galimo poveikio dirvožemio degradacijai, vandens taršai ir biologinės įvairovės nykimui. Atsižvelgiant į šias aplinkybes, tvarios žemės ūkio praktikos (angl. *Sustainable agricultural practices, SAPs*) taikymas įgavo pagreitį kaip perspektyvi strategija, padedanti išlaikyti pusiausvyrą tarp maisto gamybos poreikių, aplinkos tausojimo ir ekonominio tvarumo [28].

Tvari ūkininkavimo praktika apima įvairius metodus, skirtus žemės ūkio veiklai suderinti su ekologiniais procesais. Ekologinis ūkininkavimas, viena iš labiausiai pripažintų tvarių praktikų, kuri vengia sintetinių trąšų ir pesticidų bei stengiasi natūraliai gerinti dirvožemio sveikatą ir biologinę įvairovę. Agroekologija, kita svarbi paradigma, integruoja ekologinius principus į žemės ūkio sistemas, ūkius laiko ekosistemomis ir skatina augti biologinę

įvairovę, atsparumą bei išteklių naudojimo efektyvumą. Kita vertus, tikslusis žemės ūkis naudoja priemones, skirtas optimizuoti sąnaudas, sumažinti atliekas ir padidinti ūkininkavimo operacijų tikslumą. Be aplinkosaugos problemų, ūkininkavimo praktikos ekonominis tvarumas yra labai svarbus aspektas [29]. Tvarus žemės ūkis dažnai laikomas ekonomiškai perspektyviu ilgalaikėje praktikoje ir gali turėti naudos, tokios kaip sumažėjusios cheminių trąšų sąnaudos, geresnis augalų atsparumas abiotiniams ir biotiniams aplinkos veiksniams ir didesnės tvariai pagamintų prekių rinkos galimybės (1.1 pav.) [30].



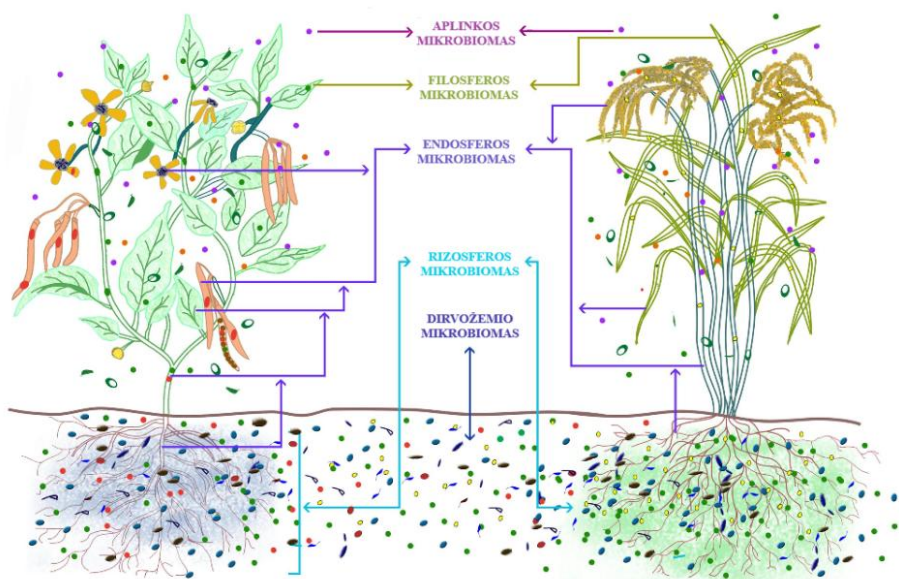
1.1 pav. Aplinkos veiksnių įtaka augalų produktyvumui. Abiotiniai ir biotiniai veiksniai, pagal Umar, B. O. ir kt. (2021) [31].

Pastaraisiais metais tvartos žemės ūkio praktikos įgyvendinimas tapo gyvybiškai svarbia šių problemų sprendimo strategija. Šį perėjimą prie tvaraus žemės ūkio skatina ne tik tikslas didinti pasėlių produktyvumą, bet ir būtinybė sumažinti neigiamą tradicinio ūkininkavimo poveikį aplinkai. Tvarus ūkininkavimas prisideda prie geresnės dirvožemio struktūros, didesnio vandens sulaikymo ir geresnio maistinių medžiagų prieinamumo augalams, o tai teigiamai veikia pasėlių derlių. Be to, taikant agroekologines koncepcijas galima sukurti labiau prisitaikančią ir atsparesnę žemės ūkio sistemą, kuri geriau išstovės ekstremalios oro sąlygos ir klimato nuspėjamumą [32].

1.2. Mikroorganizmų ir augalų tarpusavio sąveikos

Tobulėjant technologijoms tampa vis svarbiau taikyti tvaraus ūkininkavimo metodus. Vienas iš naujų ir svarbių metodų yra naudingų mikroorganizmų įterpimas į žemės ūkio paskirties dirvožemį. Per pastaruosius kelis dešimtmečius mikroorganizmai, turintys augalų augimą skatinančių savybių (angl. *Plant growth-promoting microorganisms*, PGP), buvo izoliuoti ir naudojami kaip mikrobiologinės trąšos, siekiant padidinti organinių medžiagų kiekį dirvožemyje, pagerinti maistinių medžiagų prieinamumą augalams, o taip pat paskatinanti bendrą dirvožemio sveikatą ir derlingumą. Daugelis augalų augimą skatinančių mikroorganizmų (AASM) gali turėti įtakos augalų augimo savybėms tam tikrais tiesioginiais ar netiesioginiais būdais [33]. Tiesioginiai mechanizmai apima augalų augimą skatinančių medžiagų, tokių kaip organinės ir neorganinės rūgštys, fitohormonai, cukrūs ir egzopolisacharidai, gamybą. Netiesioginiai mechanizmai apima prevenciją žalingam patogenų poveikiui išskiriant priešgrybelinius ar antibakterinius junginius, pavyzdžiui, sideroforus (mažos molekulinės masės junginius, kuriuos gamina mikroorganizmai tam, kad prisijungtų ir perneštų geležį iš aplinkos į savo ląsteles) ar fermentus, skirtus patogeninių mikroorganizmų ląstelių sienelę ardančiam poveikiui. Iš esmės, natūralioje aplinkoje augalai gyvena sąveikaudami su įvairiais mikroorganizmais. Šie mikroorganizmai sąveikaudami su augalais ir taipogi vieni su kitais tarpusavyje sudaro labai sudėtingą santykių tinklą vadinama mikrobiomu [34, 35].

Augalų mikrobiomas gali būti apibūdinamas kaip įvairių mikroorganizmų (tokių kaip bakterijų, grybų, aktinomicetų, pirmuonių ar virusų) bendrijų, gyvenančių įvairių augalų dalių paviršiuje, vidiniuose jų audiniuose ar dirvožemyje, visuma. Augalų mikrobiomą sudaro aplink augalą esantis jo aplinkos mikrobiomas; ant augalų paviršiaus egzistuojantis filoferos mikrobiomas; įvairiuose augalų audiniuose aptinkamas endosferos mikrobiomas; dirvožemyje, augalų šaknis supantis rizosferos mikrobiomas; ir paties aplinkinio dirvožemio mikrobiomas (**1.2 pav.**) [36]. Dirvožemio mikrobiomas yra pagrindinis ir pirminis šaltinis, iš kurio augalas kuria bendrą savo mikrobiomo profilį. Visą evoliucijos laikotarpį augalai vystėsi prisitraukdami iš dirvožemio jiems naudingus mikroorganizmus kaip savo vegetacijos partnerius [37]. Tačiau plėtojant žemės ūkį ir naudojant chemines trąšas bei netaikant sėjomainos augalų ir mikroorganizmų asociacijos buvo sutrikdytos, o tai sukėlė problemų, tokių kaip biologinės įvairovės nykimas, augalų maistinių medžiagų vartojimo efektyvumo sumažėjimas, padidėjęs augalų jautrumas patogenams ir ligoms, nesugebėjimas įveikti abiotinių ir biotinių stresą sukeliančių veiksnių [38, 39].



1.2 pav. Augalų mikrobiomą sudaro įvairios mikroorganizmų bendruomenės, gyvenančios augalų dalių paviršiuje ir (arba) vidiniuose augalų audiniuose. Rizosfera, endosfera ir filosfera yra pagrindinės grupės, kuriose egzistuoja mikroorganizmų bendruomenės. Dirvožemio mikrobiomas yra pagrindinis šaltinis, iš kurio augalas pasirenka ir formuoja bendrą savo mikrobiomo profilį. Augalo genotipas (pvz., pupelių kultūra ir ryžių kultūra), jo šaknų eksudatai (žymima mėlyna spalva pupelėms ir žalia ryžiams), dirvožemio tipas ir savybės bei aplinkos veiksniai turi įtakos augalo mikrobiomo sandarai (tai iliustruoja skirtingų spalvų mikroorganizmai, gyvenantys pupelių ir ryžių augalų dalyse), pagal Gopal, M. ir Gupta, A. (2016) [40].

Detalesnis supratimas apie augalų mikrobiomo poveikį atvėrė naujas augalininkystės gerinimo strategijas. Augalų mikrobiomas gali būti naudingas įvairiais būdais, įskaitant augalų apsaugą nuo patogenų ir infekcinių ligų, tolerancijos įvairiems abiotiniams ir biotiniams veiksniams didinimą, vaidina svarbų vaidmenį augalų sveikatos ir produktyvumo didinimui bei suteikia augalams atsparumą reaguojant į klimato pokyčius. Nors augalų mikrobiomo tyrimai pastaraisiais dešimtmečiais sulaukė didelio mokslinių tyrimų dėmesio, tačiau reikia suprasti, kad sudėtingai ir dinaminei augalų ir mikroorganizmų sąveikai didelę įtaką daro pats augalas-šeimininkas, mikroorganizmai ir visa aplinkos visuma, o tai sudaro trijų dalių kompleksą, kuris nulemia bendrą komunikacijos rezultatą [41]. Dauguma mokslinių tyrimų atlikta su pavienių mikroorganizmų ląstelių įnešimu į dirvožemį ar ant augalų paviršiaus, tačiau reikia pabrėžti, kad dauguma tyrimų vyksta *in vitro* ir iš esmės steriliomis sąlygomis. Tai reiškia, kad norint gauti tikslesnius tyrimų rezultatus mikroorganizmo ląstelės turi patekti į vietinę nesterilią aplinką ir natūraliai konkuruoti su vietiniu mikrobiomu. Konkurencija su vietiniu mikrobiomu turi

didžiulį poveikį ir vieno mikroorganizmo adaptacija, pavyzdžiui, augalų rizosferoje, gali būti nepakankamai sėkminga. Kad mikroorganizmai parodytų teigiamus rezultatus *in situ* bandymuose, reikia išsamių žinių apie vietinę mikroorganizmų biologinę įvairovę ir gausą augalo mikrobiome bei mikroorganizmų sąveiką su augalu-šeimininku [42].

Kaip augalai įdarbina sau naudingą mikrobiomą ir kaip jie atskiria mutualistinius mikroorganizmus nuo patogeninių mikroorganizmų yra dar tik atsakytinas ir daug tyrimų reikalaujantis klausimas, kuriam neabejotinai reikia supratimo apie sąveikos tinklus, signalizacijos kelius bei šiuose tinkluose ir keliuose dalyvaujančias molekules ir metabolitus susijusius su mikrobiomo suformavimu. Be to, didžiojoje dalyje augalų-šeimininkų ir mikroorganizmų sąveikos tyrimų naudojami modeliniai ir lengvai kultivuojami augalai, tokie kaip baltažiedis vairėnis (*Arabidopsis thaliana*), pasižymintis aiškiai ištirtu genomu ir palankiomis genetinėmis savybėmis, o duomenų apie žemės ūkio augalų rūšis ir jų sąveika su mikroorganizmais vis dar trūksta. Visame pasaulyje egzistuoja daugiau nei 300 000 skirtingų augalų rūšių, kurios, kaip tikimasi, turi plačius ir įvairius sąveikos būdus ir rūšiai specifinį mikrobiomą. [43, 44]. Atsižvelgiant į tai ir siekiant suteikti naujų įžvalgų apie molekulinę sąveiką ir naudingų mikroorganizmų, kurių funkcija natūraliose ekosistemose vis dar iki galo nežinoma, įveiklinimą reikalingi tikslesni ir detalesni tyrimai mokslo srityje.

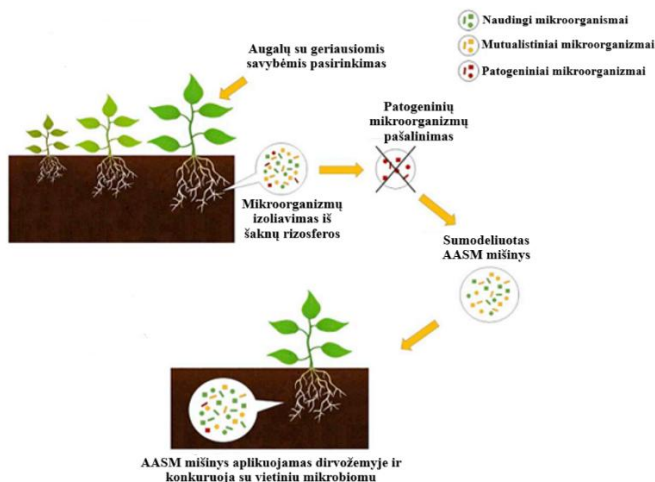
1.3. Sintetinių mikroorganizmų bendruomenių reikšmė žemės ūkyje

Pastaraisiais dešimtmečiais didėja susidomėjimas rizosferoje egzistuojančių mikroorganizmų bei jų bendruomenių potencialo panaudojimu, siekiant pagerinti pasėlių produktyvumą ir augalų vegetacijos procesus [45]. Pagrindinis dėmesys atkreipiamas į manipuliavimą rizosferos mikroorganizmų bendruomene įnešant į dirvožemį papildomus naudą suteikiančius mikroorganizmus. Įprasti inokuliantai, sudaryti iš mikroorganizmų ląstelių ir naudojami dabartinėje žemės ūkio praktikoje, paprastai yra sudaryti iš monokultūros, izoliuotos ir atrinktos atliekant *in vitro* atrankos tyrimus bei siekiant nustatyti augalų augimą skatinančią veiklą arba inokuliacijos eksperimentus kontroliuojamomis augimo sąlygomis [46]. Nepaisant to, kad šios strategijos yra plačiai priimtose ir žinomos, jos neapima svarbių augalų ir mikroorganizmų sąveikos aspektų. Be to, naudojant šiuos įprastus metodus sukurti inokuliantai dažnai nesugeba užmegzti ir palaikyti asociacijų su kultivuojamais augalais lauko sąlygose, o tai duoda nereikšmingus rezultatus. Sėkmingas inokuliantas turi konkuruoti su vietiniais mikroorganizmais, veiksmingai kolonizuoti augalus ir sukurti stabilias bei

atsparias asociacijas, nepaisant aplinkos ir dirvožemio mikroorganizmų sudėties pokyčių per visą augalų vegetaciją ir kultivavimo sezoną [47].

Monokultūros taikymo žemės ūkyje alternatyva galėtų būti sintetinių mikroorganizmų bendruomenių sudarymas, nes šios bendruomenės turi didesnę galimybę išgyventi ir funkcionuoti nesterilioje aplinkoje. Šia strategija siekiama sukurti *SynComs* (angl. *Synthetic Communities*), kurios galėtų teigiamai paveikti dirvožemį bei kultivuojamas augalų rūšis [48]. Vienas veiksmingiausių aspektų susideda iš galimybės identifikuoti pagrindinius mikroorganizmus, susijusius su augalu-šeimininku ir suformuoti tinkamos kompozicijos *SynComs*. Tačiau moksliniai tyrimai susiduria su problemomis, nes nėra atliktų išsamių analizių, kurios suteiktų žinių apie *SynComs* gebėjimą kolonizuoti ir sąveikauti su vietiniu dirvožemio mikrobiomu. Šiuo metu tipiškos *SynComs* dažnai apima augalų augimą skatinančias bakterijas ir arbuskulinės mikorizės grybus, kurių tikslas – padidinti metabolitų (pvz. eterinių aliejų, cukrų, organinių ir neorganinių rūgščių, lakiųjų junginių, vitaminų, fermentų, fitohormonų) ir maistinių medžiagų (pvz., N, P, K) kiekį. Svarbu tai, kad mikroorganizmų ir naujos aplinkos suderinamumas yra esminis aspektas kuriant *SynComs* [49]. Atsižvelgiant į mikroorganizmų skirtumus ir dirvožemio nevienalytiškumą, tai yra sudėtinga užduotis. Pirmiausiai, mikroorganizmų kilmė yra labai svarbi kuriant *SynComs*, o geros kokybės pasėlių dirvožemio mikrobiomas yra idealus *SynComs* šaltinis. Atsirandant naujoms technologijoms naujos kartos sekoskaitos metodai leidžia geriau suprasti visą pasėlių mikroorganizmų bendruomenę naudojant metagenomikos metodus, kas anksčiau buvo neįmanoma užduotis. Taikant šiuos metodus nustatyta, kad norint pagerinti augalų vegetaciją reikalinga inokuliuoti tik pagrindinius AASM [50]. Antras svarbus žingsnis yra šių pagrindinių AASM kultivavimo metodai. Kaip žinoma, apie 99 % dirvožemio mikroorganizmų negali būti auginami *in vitro* sąlygomis, todėl sunku izoliuoti visas grynas mikroorganizmų kultūras, kurios sudaro visą augalo mikrobiomą [51]. Norint gauti optimalią *SynComs* sudėtį labai svarbu rasti tinkamas ir suderinamas mikroorganizmų auginimo sąlygas. Trečia, mikroorganizmų sąveikos optimizavimas yra labai svarbus kuriant stabilų, efektyvų ir kontroliuojamą *SynComs*. Bendradarbiavimas tarp *SynComs* narių yra labai svarbus norint sukurti pasėlių kokybę ir augalų produktyvumą gerinantį poveikį. Iš tiesų, dirvožemio sąlygų svyravimai, tokie kaip dirvožemio tipas, drėgmė, maistinių medžiagų kiekis ir pH, gali turėti įtakos *SynComs* veikimui natūraliomis lauko sąlygomis. Taigi, sukomponuotų *SynComs* veiksmingumo vertinimas paskutiniuose analizės etapuose turėtų būti atliktas ir žemės ūkio paskirties pasėliuose *in situ* natūraliomis lauko sąlygomis [49]. Be to, norint nustatyti *SynComs* poveikio stabilumą realioje

praktikoje, reikia santykinai ilgesnio bandymų laikotarpio (2–3 metų). Prieš įnešant *SynComs* į dirbamą žemę, reikia įvertinti jų invaziškumą. Svarbu išsiaiškinti, kaip įvesti mikroorganizmai išgyvena arba kolonizuoja pasėlių augalų-šeimininkų rizosferą, kaip *SynComs* sąveikauja su vietiniu dirvožemio mikrobiomu bei kaip vietinis dirvožemio mikrobiomas struktūriškai ir funkciškai reaguoja į įneštą *SynComs* (**1.3 pav.**). Prieš diegiant naujus būdus žemės ūkyje ir naudojant *SynComs* platesniu mastu svarbu išsiaiškinti visus šiuos aspektus [52].



1.3 pav. Mikroorganizmų, pasižyminčių augalų augimą skatinančiomis savybėmis, atranka ir jų mišinio sumodeliavimas, pagal Qiu, Z. ir kt. (2019) [53].

Tinkamas inokuliantas turi konkuruoti su kitais mikroorganizmais, efektyviai kolonizuoti dirvožemį ar įvairias augalų dalis bei sudaryti tvirtą ryšį su augalais per visą jų kultivavimo sezoną. Manipuliavimas esamomis natūraliomis mikroorganizmų bendruomenėmis *in situ* yra svarbus būdas pagerinti augalų sveikatą ir produktyvumą, o tai padidina mikroorganizmų populiaciją jau esančią dirvožemyje ir augalų aplinkoje, įgimtą įvairovę ir funkcionalumą. *In situ* mikrobiomų inžinerija taip pat apima mikrobiologinių inokuliantų naudojimą, kurie yra specialiai pritaikyti vietiniam mikrobiomui sustiprinti. Nors *SynComs* taikymas augalininkystei yra tik pradiniam etape, technologijų pažanga vyksta nepaprastu tempu ir tai yra požiūris, galintis pasiūlyti sprendimą siekiant tvaresnio žemės ūkio. *SynComs* susideda iš izoliuotų ir kruopščiai atrinktų mikroorganizmų rūšių, kad būtų sukurta norima mikroorganizmų kompozicija [54]. Pavyzdžiui, siekdami išvalyti naftos užterštus dirvožemio plotus Asame, Indijoje, biologai sugebėjo sukurti *SynComs*, kurios galėjo išskirti biologiškai aktyvias paviršiaus medžiagas ir efektyviai skaidyti angliavandenilius. Jų eksperimente buvo naudojami penki

skirtingi angliavandenilius skaidančių bakterijų deriniai siekiant išsiaiškinti, kurios *SynComs* sudėtys geriausiai suskaidė poliaromatinius angliavandenilius. Nustatyta, kad *Bacillus pumilus* KS2 ir *Bacillus cereus* R2 derinys buvo veiksmingiausias ir po 5 savaitių suardė bendrą naftos angliavandenilių (angl. *Total petroleum hydrocarbons, TPH*) kiekį iki 84,15 % [55]. Kitame tyrime nustatyta, kad žemės ūkyje naudojant pesticidus dirvožemio biologinė įvairovė tampa menka, tačiau pastebėta, jog kai kurios bakterijų rūšys, naudojo medžiagų apykaitos kelius pesticidams skaidyti. Nustatyta, kad *Bacillus polymyxa* ir *Pseudomonas fluorescens* po 12 parų suardė net iki 48,2 % pesticido aldrino. Tačiau kai šie mikroorganizmai buvo panaudoti kartu su kai kuriomis kitomis mažiau efektyviomis, tačiau vietinėmis bakterijų rūšimis į *SynComs*, pesticidų skilimas tomis pačiomis sąlygomis padidėjo iki 54,0 %. Padaryta prielaida, kad pesticidų skaidymo pajėgumas gali būti padidintas tik kartu kultivuojant skirtingus mikroorganizmus, o kadangi šie mikroorganizmai aplinkoje natūraliai egzistavo kartu, tai reiškia, kad jie yra priklausomi vieni nuo kitų dėl sudėtingų ryšių bei signalizacijos kelių [56].

Mikroorganizmų inokuliacija žemės ūkyje prasideda nuo kruopščios izoliatų atrankos, siekiant nustatyti augalų augimą skatinančias savybes kontroliuojamomis sąlygomis. Pagrindinės savybės yra fosfatų tirpinimas, azoto fiksavimas, sideroforų gamyba ir augalų hormonų reguliavimas [57]. Izoliatai, kurie parodo teigiamus rezultatus laboratorinėmis sąlygomis, yra testuojami atliekant analizes šiltnamiuose ir vėliau vertinami lauke natūraliomis sąlygomis. Tokie veiksniai kaip konkurencija su natūralia mikroflora ir kintamieji aplinkos veiksniai gali pakenkti inokulianto poveikiui. Nauji metodai skatina naudoti AASM mišinius, o ne vienos genties inokuliantus, kad būtų padidintas veiksmingumo patikimumas įvairiomis lauko sąlygomis [58]. AASM mišiniai siūlo papildomus augalų augimą skatinančius efektus ir patogenų slopinimą, stiprina augalų sveikatą ir atsparumą. *SynComs* pritaikymas esant įvairioms aplinkos sąlygoms ir augalų genotipams dar labiau padidina jų veiksmingumą. Nepaisant to, būtini nuolatiniai tyrimai, siekiant koreguoti *SynComs* pasirinkimą ir optimizuoti jų veiksmingumą lauko sąlygomis.

1.4. Fosforas žemės ūkyje ir jo reikšmė augalų vegetacijos procesams

Fosforas yra vienas iš labiausiai reikalingų mineralinių elementų augalų vystymuisi bei augimui. Augalų ląstelėse fosforas labai svarbus energijos bei maisto medžiagų apykaitos procesuose, ląstelių dalijimosi etapuose, skatina gyvybingumą ir atsparumą ligoms. Labai svarbu aprūpinti augalus fosforu jau

ankstyvoje jų vegetacijos pradžioje. Daugiausiai fosforo kaupiasi ten, kur vyksta intensyvi organinių medžiagų sintezė – jaunose augančiose augalo dalyse. Dažnai fosforas iš senų lapų pernešamas į intensyvaus augimo zonas, dėl to fosforo trūkumo požymiai pirmiausiai pastebimi senuose augalų lapuose. Kai augalams trūksta fosforo sulėtėja jų augimas, sumažėja produktyvumas ir suprastėja derliaus kokybė. Fosforo trūkumo pasekmių vėliau negalima pašalinti net ir padidinus tręšimo normas, todėl būtina augalus aprūpinti fosforu jų vegetacijos pradžioje. Blogas aprūpinimas ar trūkumas ženkliai sumažina augalų augimą ir derlių [59].

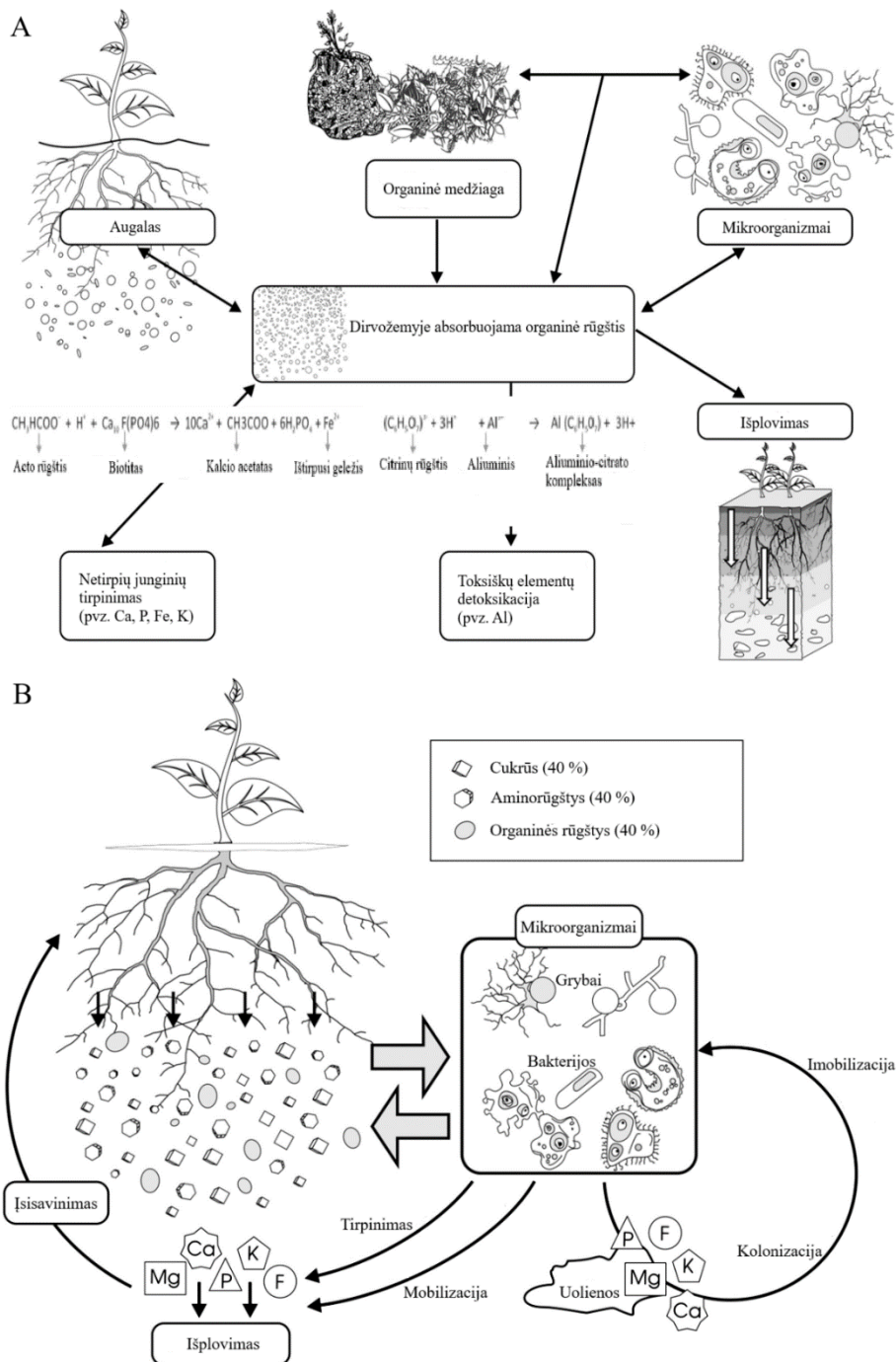
Dirvožemyje fosforo yra įvairiose organinėse ir neorganinėse formose ir kurios sudaro atitinkamai nuo 30 iki 50 % ir nuo 35 iki 70 % viso bendro fosforo kiekio [60]. Rūgščiuose dirvožemiuose neorganinis fosforas dažniausiai randamas kaip netirpūs mineraliniai junginiai, tokie kaip geležies ir aliuminio fosfatai. Šarminiuose dirvožemiuose neorganinis fosforas sulaikomas netirpių kalcio fosfatinių junginių. Augalai natūraliai pasiima fosforą iš dirvožemio kaip H_2PO_4^- , kurio $\text{pH} < 7,2$, arba kaip HPO_4^{2-} , kurio $\text{pH} > 7,2$. Tačiau daugeliu atvejų fosforas yra stipriai absorbuojamas ir lengvai sulaikomas dirvožemyje, todėl paprastai tik 0,1 % dirvožemyje esančio fosforo yra augalams prieinamos formos. Tirpus fosforas augalams jų vegetacijos ciklo metu yra dažniausiai rekomenduojamas makroelementas [61].

Norint subrandinti gerą derlių neužtenka dirvožemyje esančių maisto medžiagų, todėl augalus būtina papildomai tręšti organinėmis, mineralinėmis ar mikrobiologinėmis trąšomis. Jau nuo senų laikų žemdirbiai ieškojo būdų, kaip padidinti žemės derlingumą bei auginamų augalų gausumą. Tuo metu fosforo trąšas atstodavo organiniai ištekliai, kuriuose daugiausiai yra gyvulinės ir (arba) augalinės kilmės anglies junginių – mėšlas, šiaudai, pelenai, dumblas, durpės, kaulų miltai, kompostas, guanas [62]. Laikui bėgant pramoniniu būdu chemiškai arba mechaniškai perdurbant neorganines žaliavas, tokias kaip fosforitą ar apatitą, dolomitą, kalio druskas ir t.t., pradėti gaminti neorganinės kilmės produktai – mineralinės trąšos. Šių mineralinių trąšų atsiradimas buvo viena iš pagrindinių priežasčių, kodėl XX a. 5-ajame dešimtmetyje prasidėjo „Žalioji revoliucija“. Šiuo laikotarpiu buvo pastebima labai sparti globalizacija, didelis žemės ūkio gamybos šuolis, pradėtos gaminti įvairios trąšos, pesticidai, praplėsta žemės ūkio rinka. Žemės ūkio trąšose fosforo pentoksidas (P_2O_5) dažnai minimas kaip pagrindinė trąšų sudėtinė dalis. Tačiau šis tradicinis tręšimo būdas pastaraisiais dešimtmečiais lėmė pernelyg didelį fosforo kaupimąsi dirvožemyje. Atsižvelgiant į didėjantį susirūpinimą dėl klimato kaitos, būtina taikyti inovatyvias technologijas, kurios pagerintų fosforo panaudojimo efektyvumą ir valdymą [63]. Nors

mineralinės fosforo trąšos užima svarbią vietą žemės ūkyje visgi tai turi ir savų trūkumų. Mineralinių fosforo trąšų sintezė yra labai daug energijos suvartojantis procesas, o jų naudojimas turi ilgalaikį poveikį aplinkai, susijusį su eutrofikacija, dirvožemio derlingumo sumažėjimu, anglies išsiskyrimu. Tokie aplinkosaugos aspektai paskatino ieškoti tvaresnių būdų augalus aprūpinti maisto medžiagomis [64]. Atsižvelgiant į tai, netirpius fosfatinius junginius tirpinantys mikroorganizmai buvo laikomi geriausiomis ekologiškomis priemonėmis. Šie mikroorganizmai atvėrė naują horizontą: pradėtos gaminti mikrobiologinės trąšos, kurios turėjo nepaprastai gerą pasisekimą ne tik aprūpinant augalus maisto medžiagomis, bet ir saugant bei tausojant aplinką [65].

Dirvožemyje mikroorganizmų sukeltas mineralinės fosforo frakcijos tirpinimas yra susijęs su fenolinių junginių, sideroforų, organinių rūgščių ir protonų sekrecija, o pastarieji sukelia dirvožemio pH kitimą ir dėl to vyksta fosforo mobilizacija iš mineralinių šaltinių. Kita vertus, organinės rūgštys (OR) dėl karboksilo ir hidroksilo funkcinių grupių, pasižymi dideliu afinitetu tokiems katijonams kaip Ca^{2+} , Fe^{3+} ir Al^{3+} , todėl skatina fosforo mobilizaciją ligandų mainų reakcijomis [66]. Tačiau nuo mikroorganizmų priklausomo fosforo tirpinimo efektyvumas skiriasi priklausomai nuo išsiskiriančių OR kiekio, stiprumo ir jų tipo. Pavyzdžiui, tri- ir dikarboksirūgštys (pvz., citrinų, fumaro, glutaro, ketoglutarų, obuolių, malono, gintaro, oksalo, vyno rūgštys) yra veiksmingesnės tirpinant netirpius fosfatinius junginius nei monokarboksirūgštys (pvz., acto, gliukono, glikolio, pieno rūgštys) [67]. Be to, pastebėta, jog gramneigiamos bakterijos dėl savo didžiausio gebėjimo gaminti OR veiksmingiau tirpdo mineralinius fosfatus nei gramteigiamos bakterijos. Gerai žinoma, kad mikroorganizmų OR sintezė ir išskyrimas nepriklauso nuo jų genetinės giminystės; be to, kiekviena bakterijų rūšis pasižymi savybe išskirti OR neorganinio fosforo tirpinimo metu. Todėl, atsižvelgiant į bakterijų rūšis, auginamas skystoje terpėje, kurios sudėtyje yra $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, buvo nustatyti skirtingi OR mišiniai [68, 69]. Pavyzdžiui, *Burkholderia multivorans* išskyrė oksalo, gliukono ir pieno rūgštis, kurios turėjo teigiamą įtaką netirpių fosfatinių junginių tirpinime [70]. Taip pat literatūroje aptinkama gana daug informacijos, kurioje nurodyta, kad įvairios *Bacillus* rūšys, tokios kaip *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. pumilus* ir *B. megaterium*, išskiria gliukono, 2-ketoglikono, citrinų, oksalo, pieno, obuolių, propiono ir fumaro rūgštis. Šios organinės rūgštys prisideda prie netirpių fosfatinių junginių tirpinimo ir gali pagerinti augalų prieinamumą prie fosforo. Mokslinio tyrimo metu nustatyta, jog *Bacillus* sp. MVY-004 išskyrė citrinų, gintaro, 2-ketoglikono, gliukono, obuolių, pieno ir oksalo rūgščių mišinį, kurie dalyvavo fosfatinių junginių tirpinimo procesuose [71].

Sudėtingi santykiai tarp dirvožemio, rizosferos ir augalų vaidina pagrindinį vaidmenį nustatant fosforo prieinamumą augaluose. Augalai sukūrė prisitaikančius mechanizmus, kad susidorotų su fosforo trūkumu, pakeisdami savo šaknų morfologiją ir architektūrą, o tai pagerina fosforo įsisavinimo efektyvumą. Esant fosforo trūkumui, augalai padidina ilgesnių šakniaplaukių formavimą ir didesnę antrinių šaknų augimą, kad pagerintų fosforo absorbciją [72]. Augalų hormonas auksinas vaidina lemiamą vaidmenį reguliuojant šaknų sistemos architektūrą žemos koncentracijos fosforo sąlygomis. Jis skatina antrinių šaknų augimą ir sustiprina šakniaplaukių vystymąsi taip padidindamas paviršiaus plotą, skirtą fosforui įsisavinti [73]. Nustatyta, kad kiti augalų hormonai, įskaitant citokininus, giberelinus ir abscizo rūgštį, taip pat yra svarbūs reguliuojant augalų atsaką į fosforo trūkumą. Šaknų eksudacija yra dar viena svarbi strategija, kurią augalai naudoja siekdami susidoroti su fosforo trūkumu. Šis procesas apima aktyvų organinių junginių išsiskyrimą iš šaknų į rizosferą, vėliau pakeičiant dirvožemio savybes ir palengvinant fosforo įsisavinimą [74]. Šaknų eksudatai taip pat sąveikauja su mikroorganizmais, gyvenančiais rizosferoje, skatindami naudingų mikroorganizmų, kurie aktyviai prisideda prie fosforo įsisavinimo, dauginimąsi. Šie mikroorganizmai sukuria sudėtingas asociacijas su augalų šaknimis, palengvindami fosforo pernešimą iš dirvožemio mainais į anglies junginius, gaunamus fotosintezės metu [75]. Šaknų eksudatai yra vertingas anglies šaltinis, skatinantis mikroorganizmų augimą ir kolonizaciją ant augalų šaknų. Be to, šaknų eksudatai atlieka pagrindinį vaidmenį formuojant mikroorganizmų bendruomenę rizosferoje, skatinant fosfatus tirpinančių bakterijų dauginimąsi. Apibendrinant galima pasakyti, kad augalai taiko įvairias strategijas, kad padidintų fosforo įsisavinimo efektyvumą, įskaitant jų šaknų morfologijos pakeitimus, organinių rūgščių išsiskyrimą, fitohormonų reguliaciją ir simbiotinių asociacijų su mikroorganizmais kūrimą. Šaknų eksudatai taip pat daro didelę įtaką mikroorganizmų bendruomenei rizosferoje, skatindami naudingą sąveiką, kuri dar labiau prisideda prie didesnio fosforo prieinamumo augalams [76, 77] (**1.4A pav.**).



1.4 pav. Konceptinis dirvožemio organinių rūgščių šaltinių, dinamikos ir vaidmenų modelis (A) bei dirvožemio biologinių rūšių per organines rūgštis vykdomos mineralų mobilizacijos ir tirpimo dirvožemyje schema (B) pagal Adeleke, R. ir kt. (2017) [78].

Augalinės kilmės dirvožemio organinės rūgštys yra augalų šaknų eksudatų sudedamoji dalis. Šaknų eksudatai susideda iš daugybės sudėtingų junginių, būtent fermentų, paprastų ir sudėtingų cukrų, aminorūgščių, fenolių, vitaminų, purinų, nukleozidų, baltymų, flavinoidų ir organinių rūgščių. Iš šių junginių, aptinkamų šaknų eksudatuose, cukrų, aminorūgščių ir organinių rūgščių koncentracijos paprastai yra didžiausios, tačiau variacijos gali būti labai įvairios. Augalų šaknų eksudacijai didelę įtaką daro įvairūs biotiniai ir abiotiniai veiksniai dirvožemyje. Tokie veiksniai gali apimti mechaninius trukdžius, turinčius įtakos šaknų morfologijai, fiziologinis stresas, pavyzdžiui, sausra arba metalų toksiskumas, maistinių medžiagų trūkumas dirvožemyje ir kai kurie fiziniai dirvožemio pokyčiai, tokie kaip temperatūra, šviesa ir dirvožemio drėgmės būklė [78].

Dirvožemio mikroorganizmai, tokie kaip bakterijos ir grybai, taip pat išskiria organines rūgštis. Šie mikroorganizmai naudoja organines rūgštis įvairiems tikslams, pavyzdžiui, kad jiems ir augalams būtų prieinami santykinai netirpūs elementai dirvožemyje. Panašiai kaip ir kai kurie kiti metabolitai, organinės rūgštys gali būti sintetamos ir išskiriamos dirvožemio aplinkoje esančių mikroorganizmų kaip prisitaikymo mechanizmas reaguojant į biotinį ir abiotinį stresą [79].

Organinės rūgštys tirpina ir mobilizuoja mineralus, tokius kaip Ca, Fe, P, K ir Mg, turinčius kompleksų susidarymo potencialą (**1.4B pav.**). Chelatinės molekulės sudaro stiprų ryšį su mineraliniais jonais ir šis procesas palengvina netirpių mineralų tirpimo greitį. Jos prilimpa prie mineralinių paviršių ir ištraukia iš jų maistines medžiagas elektronų pernešimo būdu arba suardydami deguonies jungtis kompleksiniuose mineraluose. Elektronų perdavimo mechanizmas nėra iki galo aiškus, tačiau manoma, kad jis vyksta per su membranomis susijusias molekules, tokias kaip chinonai. Iširta daugybės mikroorganizmų gebėjimas tirpinti netirpias kalcio fosfato formas [80]. Moksliniuose straipsniuose publikuota, kad augalų vystymosi metu *Pseudomonas*, *Bacillus* ir *Rhizobium* gentys dalyvauja tirpinant ir mobilizuojant sunkiai tirpias mineralines medžiagas, tokias kaip Mn, Cu, Zn, Fe ir P [81]. Organinės rūgštis produkuojantys ir dirvožemyje fosforą atpalaiduojantys mikroorganizmai pradėti naudoti mikrobiologinėse trąšose jau nuo 1950 m. Tai lėmė didelį jų pasisėkimą žemės ūkyje: padidintas fosforo prieinamumas augalams bei optimizuotas jo įsisavinimas. Naudojant mikrobiologines trąšas buvo paskatintas dirvožemio gyvybinių funkcijų atsistatymas ir tuo pačiu atsižvelgta į aplinkosaugines problemas [80, 82].

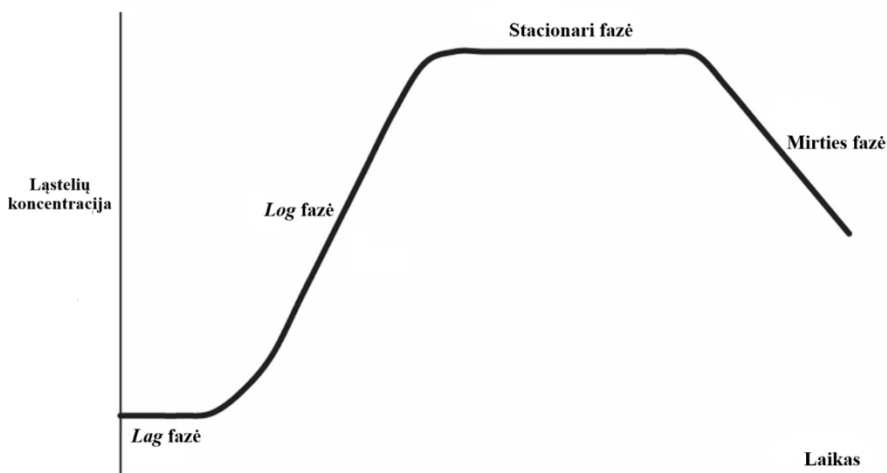
1.5. Svarbiausi veiksniai, turintys įtakos mikroorganizmų kultivavimui ir metabolitų susidarymui

Supratimas apie mikroorganizmų augimo dinamiką yra raktas į biotechnologijų taikymą. Mikroorganizmų ląstelių augimą ir dalijimąsi galima laikyti sudėtinga įvairių reakcijų ir ryšių visuma. Pagrindiniai fiziniai ir cheminiai veiksniai turintys įtakos mikroorganizmų ląstelių dalijimuisi yra maistinės terpės sudėtis, temperatūra, drėgmė, pH ir deguonies lygis bei kultivavimo laikas [83]. Viena iš dabartinių komercinės produkcijos tyrimų kryptių yra mikroorganizmų optimalių augimo sąlygų paieška ir optimizavimas. Nustatyta, kad *Bacillus* gentis yra viena iš plačiausiai paplitusių gamtoje ir dažniausiai naudojama pramoninei gamybai [84]. *Bacillus* rūšims būdingas didelis augimo greitis, gerai prisitaikančią medžiagų apykaitą ir puikias fiziologines savybes [85]. Tačiau prieš didinant gamybos mastelį masinei produkcijai proceso metodai turi būti patobulinti ir optimizuoti atliekant laboratorinio lygio fermentacijos procesus. Be to, norint sukurti žemės ūkio preparatus, reikia suprasti metabolitų, kitaip vadinamų natūraliais produktais, susidarymą [86].

Norint sukurti veiksmingą komercinį mikrobiologinį produktą reikia įveikti keletą iššūkių, įskaitant mikroorganizmų izoliavimą, atranką, gamybą ir bandymus lauko sąlygomis. Pagrindinė pramoninės gamybos užduotis yra gaminti veikliąsias medžiagas naudojant nebrangias žaliavas, o procesas turi būti ekonomiškai, tačiau kokybiškai ir veiksmingas [87, 88]. Praktiškas būdas sumažinti gamybos sąnaudas yra optimizuoti auginimo laiką, naudoti nebrangią terpę ir optimizuoti gamybos parametrus, kad būtų gauta didesnė ląstelių koncentracija. Terpės sudedamosios dalys turi atitikti pagrindinius ląstelių augimo reikalavimus, taip pat suteikti pakankamai energijos metabolismui ir ląstelių išlikimui [89]. Mikroorganizmų augimui įtakos turi labai daug įvairių veiksnių, kurie lemia jų vystymąsi ir dauginimąsi bei biologinio proceso efektyvumą. Mitybinės terpės sudėtis turi įtakos ląstelių dauginimuisi ir jose vykstantiems medžiagų apykaitos procesams. Dažniausiai pagrindinė žaliava terpeje yra daug anglies turinčios medžiagos (pvz., gliukozė, sacharozė, fruktozė, dekstrozė, krakmolai, hemiceliuliozė arba celiuliozė, melasa, manitolis), kurios gali būti gaunamos iš žemės ūkio atliekų, tokių kaip daugiafruktozis kukurūzų sirupas arba cukrinių runkelių ar cukranendrių melasa [90, 91]. Fermentacijos technologijų metu naudojami mikroorganizmai konvertuoja žaliavines medžiagas į platų įvairių metabolitų asortimentą. Pavyzdžiui, gliukozės turinčios medžiagos gali būti konvertuojamos į visiškai skirtingus produktus: tuos, kurių cheminė struktūra yra artima žaliavinei medžiagai (pvz., gliukono rūgštis) arba tuos, kurie

praktiškai struktūriškai nieko bendro neturi su pradine medžiaga (pvz., antibiotikai ir fermentai) [92, 93]. Taip pat labai svarbu, kad į mitybinės terpės sudėtį įeitų organinės kilmės medžiagos (pvz., mielių ekstraktas, sojų pupelių peptonas) savo sudėtyje turinčios azoto, aminorūgščių, mineralinių medžiagų ir vitaminų [94, 95, 96]. Azoto šaltiniai gali būti ir neorganiniai (pvz., amonio ir nitrato druskos) [97]. Atsižvelgiant į fizinius parametrus labai svarbu parinkti tinkamą temperatūrą, pH vertę, ištirpusio deguonies koncentraciją mitybinėje terpėje [98]. Teigiama, kad mikroorganizmai gali egzistuoti nuo -10 iki +95 °C temperatūros diapazone. Temperatūra yra svarbus faktorius, lemiantis ląstelių augimo intensyvumą. Atsižvelgiant į tai, kokioje temperatūroje mikroorganizmai geba augti ir daugintis, jie yra klasifikuojami į tris pagrindines grupes. Pirmai grupei priskiriami psichrofiliniai mikroorganizmai, kurie dauginasi nuo -10 iki +20 °C temperatūros diapazone. Antrai grupei priklauso mezofiliniai mikroorganizmai, kurių optimali dauginimosi temperatūra svyruoja nuo +30 iki +40 °C temperatūros, bet mikroorganizmų ląstelės gali nesivystant egzistuoti ir +10–45 °C temperatūros diapazone. Trečiai grupei priklausančios termofiliniai mikroorganizmai geriausiai vystosi aukštoje, iki +70 °C, temperatūroje [99, 100, 101]. Taip pat labai svarbus faktorius, lemiantis bakterijų biologinį aktyvumą yra aplinkos, kurioje mikroorganizmai dauginasi pH vertė. Mitybinės terpės pH vertė veikia ląstelės paviršiaus elektros krūvį, kuris reguliuoja citoplazmos membranų laidumą įvairiems jonams. Kintant pH, keičiasi mitybinės terpės medžiagų disociacijos laipsnis, o tai turi įtakos mikroorganizmų medžiagų apykaitai. Pagal terpės pH vertę mikroorganizmai yra klasifikuojami į neutrofilus, kuriems būdinga terpės pH vertė varijuoja nuo 4 iki 9, tačiau optimaliausias pH tokiems mikroorganizmams yra 7; acidofilus, kuriems tinkamiausias terpės pH yra mažesnis nei 4; ir alkalofilus – kurių ląstelių dauginimuisi optimaliausias terpės pH yra apie 9 [102]. Atsižvelgiant į deguonies poreikį mikroorganizmas, nustatyta, kad vieniems mikroorganizmams svarbus deguonis, o kiti gali egzistuoti ir bedeguonėje aplinkoje. Pagal tai bakterijos skirstomos į dvi pagrindines grupes: aerobiniai mikroorganizmai egzistuoja tik laisvo deguonies turinčioje aplinkoje, o anaerobiniai mikroorganizmai gali daugintis ir laisvo deguonies neturinčioje aplinkoje [103].

Vykstant mikroorganizmų ląstelių atliekamiems fermentacijos procesams augimas būna priklausomas nuo limituojančių faktorių atsiradimo t. y. nuo pagrindinių terpės komponentų sumažėjimo. Kai šių sudedamųjų terpės dalių koncentracija sumažėja, sulėtėja ir ląstelių dalijimasis. Mikroorganizmų augimas susideda iš šių 4 stadijų: pradinė (*lag*) fazė; eksponentinė (*log*) fazė; stacionari fazė; ir letali (žūties) fazė (**1.5 pav.**) [104].



1.5 pav. Grafinis bakterinių ląstelių auginimo kreivės vaizdas. *Lag* (pradinė) fazėje ląstelės iš pradžių prisitaiko prie naujos aplinkos; *Log* (eksponentinė) fazėje ląstelės pradeda reguliariai dalintis ir pasiekia maksimalų augimo greitį; stacionarioje fazėje ląstelių skaičius lieka nekintantis dėl maistinių medžiagų sumažėjimo mitybinėje terpėje; ir žūties fazėje ląstelės praranda gebėjimą dalytis, dalis ląstelių neišgyvena dėl nepalankių aplinkos sąlygų, pagal Wang, L., ir kt. (2015) [104].

Mikroorganizmų augimą fermentatoriuje stabdo mitybinės terpės sueikvojimas arba toksiškų šalutinių metabolizmo produktų susikaupimas. Fermentacijos proceso *lag* fazėje vyrauja maža ląstelių koncentracija, o mitybinėje terpėje gausu maistinių medžiagų [105]. Laikui bėgant pereinama į *log* fazę, kai ląstelės dauginasi sunaudodamos terpėje esančias reikalingas maistines medžiagas tuo pačiu išskirdamos savo medžiagų apykaitos produktus. Pasiekiamas ląstelių augimo pikas ir prasideda stacionari fazė, kurios metu sumažėja maistinių medžiagų kiekis bei sulėtėja ląstelių dalijimasis. Mažėjant maistinių medžiagų kiekiui bei kaupiantis kenksmingiems ląstelių medžiagų apykaitos produktams dalis ląstelių žūsta arba pereina į sporų būseną. Vis dar ieškoma būdų, kurie kuriant mikrobiologinius produktus, leistų pasiekti kuo didesnes ląstelių koncentracijas, išlaikytų gyvybingumą ir užtikrintų ilgą galiojimo laiką, o tuo pačiu būtų nesudėtingas, ekonomiškai ir tausojantis aplinką procesas [104, 105, 106].

Augalų mikrobiomas vaidina lemiamą vaidmenį tvirame žemės ūkyje, nes įvairios naudingos mikroorganizmų bendruomenės prisideda prie augalų sveikatos ir produktyvumo. Tik devintajame dešimtmetyje buvo padaryta didelė pažanga suvokiant ir išnaudojant jų potencialą [107]. Nors buvo sukurti mikrobiologiniai inokuliantai, siekiant pagerinti augalų augimą ir atsparumą aplinkos veiksniams, tačiau jų veiksmingumas realiose žemės ūkio praktikose

buvo nežinomas [108]. Tai patvirtina, kad reikia ieškoti tikslingų strategijų, skirtų optimizuoti mikroorganizmų atranką, formulavimą ir pritaikymo metodus, siekiant pagerinti eksperimentus lauko sąlygomis.

Mikrobiologinių produktų taikymas prie konkrečių pasėlių ir aplinkos sąlygų rodo didelį potencialą įveikiant dabartinius iššūkius. Būsimi tyrimai turėtų būti sutelkti į žinių spragas, susijusias su tuo, kaip inokuliantai veikia esamus natūraliai susiformavusius mikrobiomus, sudėtingą mikroorganizmų bendruomenių funkcinę dinamiką ir veiksnius, turinčius įtakos mikroorganizmų kolonizacijai žemės ūkio aplinkoje. Išsamus šių procesų supratimas yra būtinas kuriant tinkamus mikrobiologinius inokuliantus ir komercinius produktus, kurie gali klestėti įvairiose ūkininkavimo aplinkose. Norint sėkmingai dirbti žemės ūkio laukuose būtina sukurti specialiai pritaikytas formules ir sistemas, atitinkančias specifinius pasėlių reikalavimus ir aplinkos sąlygas. Novatoriški metodai, tokie kaip mikrobiologinių produktų panaudojimas lauko bandymuose, rodo galimybę padidinant mikroorganizmų kolonizaciją ir išgyvenamumą, mažinti atotrūkį tarp laboratorinių tyrimų ir praktinio pritaikymo žemės ūkio aplinkoje [107, 109].

1.6. Mikroorganizmų ląstelių produkuojami metabolitai, jų skirstymas ir funkcijos

Metabolitai yra mažos molekulinės masės (<1000 Dalton) cheminiai junginiai, kurie atlieka lemiamą vaidmenį mikroorganizmų metabolizme [110]. Visi konkretaus mikroorganizmo metabolitai bendrai vadinami jo metabolomu. Terminas „metabolomas“ pirmą kartą buvo pasiūlytas 1997 m. ir jis nusako mikroorganizmo biologinę funkciją, nes yra glaudžiai susijęs su mikroorganizmo fenotipu. Metabolinės veiklos metu metabolitai ne tik susidaro, bet ir konvertuojami į kitus įvairius junginius [111].

Paprastai biologiniuose mėginiuose yra trijų tipų metabolitų, kuriuos galima rasti tiek tarpląstelinėje aplinkoje: vandenyje tirpūs (poliniai), vandenyje netirpūs (nepoliniai) ir lakieji metabolitai. Taip pat metabolitai gali būti klasifikuojami pagal jų kilmę į endogeninius arba egzogeninius ir pagal jų pirminę arba antrinę funkciją. Endogeniniai metabolitai atsiranda ląstelės viduje, o egzogeniniai metabolitai – ląstelės išorėje. Priklausomai nuo to, kurioje augimo fazėje yra mikroorganizmų ląstelės, bus produkuojami pirminiai arba antriniai metabolitai. Pirminių metabolitų metabolizmo keliai yra susiję su metabolitų gamyba (anaboliniu aktyvumu) ir skilimu (kataboliniu aktyvumu), o antrinių metabolitų metabolizmo keliai yra susiję su mažu augimo greičiu ir reakcija į aplinkos sukeltą stresą. Nors minėtos metabolitų

klasifikacijos naudojamos mokslinėje literatūroje, tačiau ribos tarp jų nėra tiksliai apibrėžtos [112, 113, 114].

Bakterijų augimo metu nuolat sintetinami pirminiai metabolitai. Jie yra būtini išgyvenimui ir reikalingi svarbiems ląstelių procesams, tokiems kaip augimas, vystymasis ir dauginimasis. Pirminių metabolitų sintezės keliai yra užkoduoti bakterijų tipuose, todėl daugumos rūšių išskiriami pirminiai metabolitai yra panašūs. Pirminių metabolitų kiekis ląstelėje paprastai yra mažesnis nei antrinių metabolitų, tačiau taip yra ne visada, nes mikroorganizmai gali gausiai pagaminti tarpinius metabolitus iš pirminio metabolizmo ir gali juos išskirti į tarpląstelinę terpę [115, 116].

Priešingai nei pirminiai metabolitai, antriniai metabolitai nėra būtini mikroorganizmų išlikimui ir nėra būtini normaliam augimui bei vystymuisi [117]. Atvirkščiai, jie suteikia mikroorganizmams išgyvenimo pranašumą, pvz., pagerina maistinių medžiagų pasisavinimą arba apsaugą nuo aplinkos sukkelto streso veiksnių. Maistinių medžiagų trūkumas dažniausiai sukelia antrinį metabolizmą, todėl antriniai metabolitai dažniausiai susidaro stacionarioje mikroorganizmų augimo fazėje, kai išsenka maistinės medžiagos ir kaupiasi toksiškos atliekos. Todėl yra iškelta hipotezė, kad metabolitai, pagaminti per šią augimo fazę, turės didesnę biologinę aktyvumą [118]. Ayed ir kt. (2015 m.) atliktas tyrimas įrodė, kad *Bacillus amyloliquefaciens* An6 gaminamų bakteriocinų antimikrobinis aktyvumas pasiekė maksimumą stacionarioje ląstelių augimo fazėje [119]. Be to, nustatyta, kad antriniai metabolitai pasižymi didesniu kaupimosi greičiu nei pirminiai metabolitai ir kaupiasi mikroorganizmų ląstelėse arba išsiskiria į tarpląstelinę erdvę. Nors pirminis metabolizmas ir antrinis metabolizmas labai skiriasi savo susidarymo keliais, jie yra glaudžiai susiję, nes pirminis metabolizmas suteikia energijos ir pirmtakų molekulių, reikalingų antriniam metabolizmo keliui [120].

Mikroorganizmų antrinis metabolizmas yra gausus bioaktyvių molekulių šaltinis, o medžiagų apykaitos keliai yra vieni iš pagrindinių biocheminių antrinio metabolizmo kelių [121]. Tyc ir kt. (2017 m.) apžvelgė dvi pagrindines dirvožemio bakterijų antrinių metabolitų klases, būtent, lakiuosius organinius junginius (LOJ) ir polinius metabolitus. Ši klasifikacija pagrįsta metabolitų poliškumu ir difuzijos savybėmis. LOJ gali išgaruoti ir pasklisti per ląstelių poras, užpildytas vandeniu arba oru, o poliniai metabolitai dėl didelio jų poliškumo yra tirpūs vandenyje ir pasižymi ryškesniu biologiniu aktyvumu [122]. Pavyzdžiui, bakteriocinai ir lipopeptidai yra poliniai antriniai metabolitai, o pirazinai, indolas ir tam tikri sieros turintys junginiai, pavyzdžiui, dimetilsulfidas, priskiriami prie LOJ. Dimetilsulfidas buvo patvirtintas Jungtinių Valstijų aplinkos apsaugos

agentūros ir naudojamas kaip fumigantas nuo nematodų ir dirvožemyje plintančių patogenų, komerciniu pavadinimu Paladin® [123]. Pirminiai metabolitai apima aminorūgštis, nukleotidus ir galutinius fermentacijos produktus, tokius kaip etanolis ar organinės rūgštys, kurios laikomos būtinomis tinkamam mikroorganizmų augimui [124]. Antriniai metabolitai yra organiniai junginiai, susidarantys stacionarios augimo fazės pabaigoje ir nėra tiesiogiai susiję su mikroorganizmų augimu, vystymusi ir dauginimusi [125, 126]. Šie produktai daugiausia naudojami sveikatos priežiūros srityje kaip antimikrobinės medžiagos, antiparazitinės medžiagos, priešnavikiniai vaistai, fermentų slopinkliai, imunosupresantai ir kt. [127].

1929 m. Aleksandras Flemingas atrado antibiotiką peniciliną ir paskatino mokslininkus ištirti mikrobiologinių produktų terapinį vaidmenį kovojant su gyvybei pavojingomis infekcijomis. Tai lėmė masinę antibiotikų gamybą Antrojo pasaulinio karo metu, o laikotarpis iki 1960 m. buvo vadinamas antibiotikų aukso amžiumi [128]. Už antibiotikų atradimą ir koncepciją infekcinių ligų terapijoje 1945 m. A. Flemingas, H. Florey ir E. B. Chainas įvertinti Nobelio premija farmakologijos / medicinos srityje. Nuo to laiko buvo ištirta daugybė mikroorganizmų dėl jų panaudojimo įvairiose medicinos ir pramonės šakose [129].

Taip pat atlikti moksliniai tyrimai apie antrinius metabolitus, kurie veikia kaip augalų augimo stimulatoriai, herbicidai ar insekticidai. Cheminiai pesticidai, tokie kaip karbamatai ir organiniai fosforo junginiai, buvo plačiai naudojami žemės ūkio sistemoje. Jų naudojimas kenkėjų kontrolei sukelia keletą problemų, tokių kaip toksinis poveikis gamtai, žmonėms ir gyvūnams; išaugęs nepageidaujamų vabzdžių, kenkėjų ir parazitų atsparumas cheminėms medžiagoms, gruntinio vandens užterštumas [130, 131]. Biopesticidai apima biofungicidus (*Trichoderma* spp.), bioherbicidus (*Phytophthora* spp.) ir bioinsekticidus (*Bacillus thuringiensis*, *Bacillus sphaericus*) dėl biologinio skaidymo pobūdžio, didelio efektyvumo, tikslinio specifiškumo ir mažesnio pavojaus aplinkai [132].

Biologiniai pesticidai yra specifiniai tiksliniam kenkėjui ir kelia mažesnę grėsmę ekosistemoms. Nustatyta, kad *Bacillus thuringiensis* (Bt) yra gramteigiama endosporas formuojanti bakterija, turinti didžiausią reikšmę kaip insekticidinė bakterija kovojant su vikšrais, musių ir uodų lervomis bei vabalais. Bt formuojantis sporoms, gamina insekticidinį endotoksino baltymą, kuris jungiasi prie vabzdžio virškinamojo trakto ląstelinio pamušalo ir jį sunaikina, todėl vabzdys nustoja funkcionuoti ir miršta. Baltymai naikina daugiausia *Lepidoptera* vikšrus (drugelius ir drugius), uodų lervas ir juodąsias muses. Bt naudojami vaisių ir daržovių pasėliams, didelio masto pasėliams, tokiems kaip kukurūzai, sojos pupelės ar vilnamedis [133]. *Bacillus*

sphaericus yra dar viena insekticidinė bakterija, kuri buvo naudojama uodų rūšių populiacijai kontroliuoti [134]. Taip pat tam tikros *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aureofaciens* ir *Streptomyces* spp. gali užkirsti kelią augalų ligoms konkuruojant su augalų patogenais rizosferoje, gaminant priešgrybinius junginius ir skatinant augalų bei šaknų vystymąsi [135].

Biofungicidai naudojami filosferoje, endosferoje ir rizosferoje siekiant kontroliuoti augalų ligas, kurias sukelia grybai, bakterijos ar nematodai, įskaitant kai kuriuos vabzdžius kenkėjus ir piktžoles. Labiausiai paplitę komerciniai grybų biopesticidai, naudojami žemės ūkyje yra *Trichoderma* spp. ir *Beauveria bassiana* [136, 137]. *Trichoderma harzianum* yra *Rhizoctonia* sp., *Pythium* sp., *Fusarium* sp. ir kitų dirvožemyje plintančių patogenų antagonistas [138]. *Beauveria bassiana* veiksminga kovojant su augalų kenkėjais, tokiais kaip amarai, tripsai ir baltasparniai [139]. Dar vienas gerai žinomas biopesticidas yra grybas *Metarhizium anisopliae* naudojamas skėrių kenkėjų kontrolei, ypačiai Afrikoje ir Australijoje [140]. *Coniothyrium minitans* yra mikoparazitas, taikomas nuo *Sclerotinia sclerotiorum* patogeno. Jis prasiskverbia į tikslinį patogeną sudarydamas mažas poras arba suardo jo paviršių išskirdamas tokius fermentus kaip chitinazė, gliukanazė ir proteazė. Šis grybas naudojamas apsaugoti augalus, tokius kaip aliejinių augalų sėklos, pupelės, žirniai, salotos ir kt. [141].

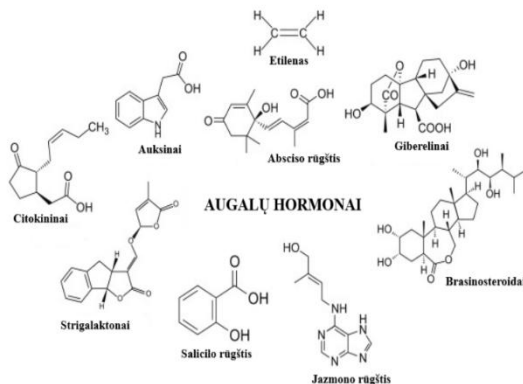
Bioherbicidai plačiai naudojami žemės ūkyje, pramonėje ir miesto teritorijose piktžolėms naikinti. Didėjant pasauliniam aplinkosauginiam sąmoningumui, bioherbicidai yra labai veiksmingi kovojant su piktžolėmis ekologišku būdu [142]. Mikrobiologinius herbicidus galima suskirstyti į mikrobiologinius preparatus (piktžoles naikinančius mikroorganizmus) ir į mikroorganizmų metabolizmo keliu gautus bioherbicidus [143]. Preparatai, kurių pagrindą sudaro *Colletotrichum* spp. ir *Phytophthora*, yra naudojami komerciniais tikslais nuo žemės ūkio piktžolių [144, 145]. Bioherbicidų rinkos augimą skatinantys veiksniai yra ekologiškas bioherbicidų pobūdis, didėjantis visuomenės supratimas ir mažesnis atsparumo kenkėjams vystymasis. Tyrimai ir plėtra biopesticidų taikymo srityje labai sumažina cheminių sintetinių herbicidų sukeliamą aplinkos taršą ir skatina tvarią žemės ūkio plėtrą [146].

Augalų augimo reguliatoriai, dar vadinami augalų hormonais ar fitohormonais, yra junginiai, kurie yra signalinės molekulės, reguliuojančios augalų augimą ir ląstelių diferenciaciją. Šie augalų hormonai veikia kartu reguliuodami ląstelių augimą ir vystymąsi [147]. Tarp augalų augimo reguliatorių tipų didžiausią rinkos dalį užima giberelinai, po jų – citokininai ir auksinai. Fitohormonus pagal poveikį augalams galima suskirstyti į dvi

grupės: augimą skatinančius ir augimą slopinančius hormonus [148, 149]. Prie augalų augimą skatinančių hormonų yra priskiriami auksinai, giberelinai, citokininai, salicilo rūgštis, o prie augimą slopinančių hormonų priskiriamas etilenas ir abscizo rūgštis [150, 151]. Bakterijų buvimas dirvožemyje ir augalų audiniuose gali pakeisti fitohormonų kiekį, o tai lemia augalų augimo, vystymosi ir gebėjimo susidoroti su stresu pokyčius. Nustatyta, kad daugybė augalų augimą skatinančių bakterijų turi gebėjimą sintetinti arba skaidyti tam tikrus augalų fitohormonus [152]. Be to, AASM gali gaminti keletą LOJ tiesiogiai skatinančių augalų augimą arba netiesiogiai paveikti fitohormonų raišką. Fitohormonai vaidina lemiamą vaidmenį leidžiant augalams prisitaikyti tiek prie biotinių, tiek prie abiotinių aplinkos veiksnių. Jie reguliuoja augalų genų ekspresiją, palengvindami augalo reakciją į aplinkos svyravimus [153]. Be to, svarbu pabrėžti, kad augalai gali išnaudoti vidinį fitohormonų skaidymo aktyvumą, kuris būdingas įvairioms dirvožemio bakterijoms, kad išlaikytų optimalų skirtingų fitohormonų lygį. Pasaulyje pirmaujantys augalų hormonų gamintojai yra *FMC Corporation* ir *The Dow Chemical Company* (JAV), *Syngenta AG* (Šveicarija), *BASF SE* (Vokietija) ir *Nufarm Limited* (Australija) [154].

1.7. Augalų hormonų sintezė ir reguliacijos keliai naudojant augalų augimą skatinančius mikroorganizmus

Fitohormonai yra organiniai junginiai, atsakingi už augalų vystymąsi. Žinoma, jog augalų rizosferoje yra nemažai AASM, galinčių moduluoti fitohormonų signalizacijos kelius. Šiuo metu yra išskiriamos aštuonios pagrindinės augalams reikalingų augalų hormonų grupės: tai auksinai, giberelinai, citokininai, abscizo rūgštis, etilenas, jazmonatai, brasinosteroidai, salicilo rūgštis ir strigalaktonai (**1.6 pav.**) [155].



1.6 pav. Augalų hormonų grupės, pagal Durmusoglu, S. ir kt. (2024) [156].

Tarp auksinų, kuriuos sintetina bakterijos, indol-3-acto rūgštis (IAA) turi didžiausią reikšmę. Tyrimai parodė, kad IAA gamina maždaug 80 % rizosferoje gyvenančių bakterijų, įskaitant tas, kurios užmezga ryšius su augalais. Tai rodo, kad jų poveikį augalų augimui daugiausia įtakoja su IAA susiję procesai [157, 158]. Be to, žinoma, kad mikroorganizmai gali gaminti fermentą 1-aminociklopropan-1-karboksilato (ACC) deaminazę, kuri veikia kaip etileno koncentracijos augaluose reguliatorius. Veikdami nepalankiomis sąlygomis augalai gamina etileną – augalų streso hormoną, kuris gali turėti žalingą poveikį, kai jo koncentracija tampa per didelė. Etilenas plačiai pripažįstamas kaip daugiafunkcis augalų hormonas, atsakingas ir už augimo, ir už senėjimo reguliavimą. Vadinasi, ACC deaminazės buvimas yra itin svarbus palaikant šio fitohormono balansą [159].

AASM gali pakeisti fitohormonų, tokių kaip auksinų ir etileno, koncentraciją rizosferoje, naudodami hormonus arba jų pirmtakus kaip anglies ir (arba) azoto šaltinius [160]. Pavyzdžiui, buvo nustatyta, kad *Serratia proteamaculans* gali naudoti sintetinį citokininį N6-benziladeniną kaip vienintelį anglies šaltinį [161]. Aprašyta, kad keletas *Pseudomonas* rūšių katalizuoja salicilo rūgšties skaidymą, taip pat yra žinoma, kad *Achromobacter*, *Burkholderia* ir *Pseudomonas* gentys skaido indol-3-acto rūgštį ir salicilo rūgštį [150, 162]. Nustatyta, kad *Azospirillum* sp. panaudojimas padidino kukurūzų šaknų tūrį bei augalų aukštį, o kviečiuose – ūglių skaičių. Šio tyrimo autoriai iškėlė hipotezę, kad poveikis kviečiams gali būti siejamas su bakterijų generuojamais fitohormonais, o viena iš pagrindinių *Azospirillum* sp. savybių yra pagrįsta fitohormonų ir kitų junginių, įskaitant giberelinus, abscizo rūgštį, auksinus, citokininus, etileną ir salicilo rūgštį, sintezė [163, 164].

Tarp įvairių biologiškai aktyvių auksinų mokslinėje literatūroje daugiausia dėmesio skiriama IAA. AASM gali paskatinti augalų šaknų vystymąsi sintetindami auksiną. Augalų inokuliacija su AASM sukelia šaknų architektūros pokyčius, kuriems pirmiausia būdingas šakniaplaukių ir antrinių šaknų padidėjimas, taip pat šaknų ilgio sumažėjimas. Šaknies paviršiaus ploto išsiplėtimas gali paskatinti didesnę šaknų eksudatų susidarymą, kurie veikia kaip substratas vystyti mikroorganizmų bendruomenei augalų rizosferoje [165]. Buvo aprašyta apie IAA produktus įvairiose AASM gentyse, tokiose kaip *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Azospirillum*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Mesorhizobium*, *Pantobacillus*, *Paenibacillus*, *Rhizobium*, *Rhodococcus*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces* ir *Rouxiiella* [166, 167, 168].

Citokininai (CK), kurie yra endogeniniai augalų hormonai, mažomis koncentracijomis atlieka lemiamą vaidmenį daugelyje fiziologinių procesų.

Šie procesai, be kita ko, apima augalų ląstelių dalijimąsi, ūglių ir šaknų vystymąsi, pumpurų formavimąsi, chlorofilo biosintezę ir maistinių medžiagų transportavimą [169]. Paplitęs augaluose randamas CK tipas yra zeatinas, kuris pirmą kartą buvo aptiktas *Zea mays* kultūroje praėjusio amžiaus šeštajame dešimtmetyje. Įrodyta, kad daugelis bakterijų rūšių gali sintetinti CK. Literatūroje aptinkamos *Methylobacterium* sp., *Bacillus licheniformis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bradyrhizobium japonicum* ir *Pseudomonas putida* mikroorganizmų rūšys gali produkuoti zeatiną, zeatino ribozidą ir izopenteniladeniną. CK sintezėje dalyvaujančių genų raiška AASM gali reikšmingai pakeisti inokuliuotų augalų fitohormonų sudėtį [150, 170].

Giberelino rūgštis (GA) moduliuoja įvairius augalų vystymosi procesus, įskaitant dygimą, augimo procesus, stiebo pailgėjimą, sėklų sudygimą, žydėjimą ir vaisių mezgimąsi. Be to, žinoma, kad jie padidina fotosintezės efektyvumą ir chlorofilo kiekį [171]. Nustatyta daugiau nei 130 skirtingų GA tipų, kurie yra suskirstyti į kategorijas nuo GA1 iki GA136. Bakterijose nustatytas ribotas GA skaičius, konkrečiai GA1, GA3, GA4 ir GA20. Verta pažymėti, kad nors augaluose tik GA1 ir GA4 pasižymi fiziologiniu aktyvumu, tačiau labiausiai paplitęs šio fitohormono variantas yra GA3, o komerciškai išgrynintas šis junginys yra plačiai prieinamas [172, 173]. Keletas tyrimų parodė *Streptomyces*, *Sinorhizobium*, *Bacillus*, *Rhizobia* ir *Bradyrhizobium* gentys gali išskirti įvairius GA, todėl šie AASM žymiai pagerina augalų vegetacijos procesus [174].

Abscizo rūgštis (ABA) reguliuoja augalų gyvavimo ciklo procesus. Ji moduliuoja augalų fiziologinių procesų, tokių kaip atsparumas stresui ir senėjimo procesui, slopinimą. Dar visai neseniai buvo manoma, kad bakterijos ABA nesintetina [175]. Tačiau 2007 m. ABA buvo aptikta *Helianthus annuus* šaknų endofitinių bakterijų kultūrose [176]. Tada gebėjimas sintetinti ABA buvo nustatytas keliuose AASM, įskaitant *Azospirillum lipoferum*, *Arthrobacter koreensis*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Bacillus licheniformis* ir *Bacillus pumilus* [177]. Manoma, kad bakterijos turi daugiau nei vieną ABA katabolinį kelią. Pavyzdžiui, įrodyta, kad bakterijos ABA skaido iki fazinių ir dihidrofazinių rūgščių. Dirvožemio bakterijų gentis *Corynebacterium* skaido ABA ir susidaro junginys, kurio spektrinės charakteristikos panašios į dehidrovomifoliolį [176].

Šiuo metu AASM įtaka augalų hormonų reguliavimui tirti naudojami įvairūs metodai. Viena iš galimų strategijų yra nustatyti fitohormonus, kuriuos sintetina bakterijos arba medžiagas, kurios daro įtaką fitohormonų gamybai augaluose. Antroji strategija apima atskirų genų, atsakingų už fitohormonų gamybą, identifikavimą [178]. Pavyzdžiui, vienas iš būdų aptikti AASM su ACC deaminazės aktyvumu yra genų, tokių kaip *acdS* genas, paieška. *acdS*

geno buvimas buvo dokumentuotas keliuose endo- ir epifitinėse bakterijose, įskaitant *Pseudomonas* gentį. Atliekant *acdS* genų paiešką buvo nustatyta reikšminga *Poaceae* šeimos ir kitų augalų rūšių rizosferos bakterijų įvairovė. Kai kurie tyrėjai taiko *acdS* genų atranką pirminei bakterijų atrankai tolesniems tyrimams. Trečioji strategija apima mutantinių rūšių, turinčių fitohormonų trūkumą arba ypatingai didelę produkciją, generavimą, o po to tyrimus dėl AASM mutantinių rūšių poveikio augalų augimui ir vystymuisi, palyginant su laukinio tipo rūšimis [179].

Norint maksimaliai padidinti AASM ir augalų sąveikos potencialą pasaulinėje augalininkystėje, reikia išsamiai apibūdinti šias sąveikas, ypatingą dėmesį skiriant fitohormonams, kuriuos išskiria ir metabolizuoja bakterijos. Kaip minėta, AASM gali endogeniškai sintetinti fitohormonus ir gaminti medžiagas, reguliuojančias augalų fitohormonų lygį. Taigi, AASM vaidina esminį vaidmenį hormoniniame augalų gyvenimo reguliavime, ypač esant sudėtingoms aplinkos sąlygoms. Nepaisant ilgalaikio organinių trąšų naudojimo ir mineralinių trąšų įvedimo XVIII–XIX amžiuje, reikia atlikti daug tyrimų ir analizių, kad mikrobiologinės trąšos taptų neatskiriama žemės ūkio, sodininkystės ir miškininkystės praktikos dalimi. Norint geriau suprasti augalų ir AASM sąveiką, reikia atlikti tolesnius išsamius tyrimus, apimančius įvairius aspektus [180].

1.8. Veiksniai, turintys įtakos mikrobiologinių preparatų panaudojimo sėkmei tvariame žemės ūkyje

Dirvožemis yra nevienalytė aplinka leidžianti vystytis daugeliui mikroorganizmų, kurie nuolat sąveikauja su kitais organizmais simbiozės, antagonizmo, parazitizmo sąlygomis ar kaip saprofitai. Dauguma AASM egzistuoja dirvožemio augalų rizosferos zonoje sudarydami simbiotinę abipusę ryšį su augalais [181]. Žinios apie mikrobiologinio inokulianto ir augalo-šeimininko fiziologines savybes yra būtinos nustatant geriausią inokuliacijos metodą. Sėkmingas mikrobiologinių preparatų inokuliacija priklauso nuo inokuliacijos metodo, inokulianto ląstelių koncentracijos, augalo-šeimininko šaknų kolonizacijos, kuri kinta priklausomai nuo mikroorganizmų dauginimosi ir pasiskirstymo rizosferoje, mikroorganizmų antagonizmo, augalų fiziologinės būklės, dirvožemio drėgmės, pH, temperatūros, bei augalo-šeimininko ir jo išskiriamų šaknų eksudatų. Šaknų eksudatų junginiai skiriasi priklausomai nuo augalų genotipo bei amžiaus ir yra pagrindiniai mikroorganizmų kolonizaciją lemiantys veiksniai. Todėl būtina įvertinti

skirtingų inokuliavimo metodų poveikį, nes tai daro įtaką AASM kolonizacijai ir sėkmei skatinant augalų vegetaciją [182].

Abiotinės sąlygos, pavyzdžiui, dirvožemio maistinės medžiagos, pH, sunkieji metalai, vandens balansas, saulės šviesos intensyvumas ir temperatūra gali pakeisti augalų rizosferos mikroorganizmų sudėtį, paveikti mikroorganizmų išlikimą, įvairovę ir AASM potencialą gerinant augalų augimą bei sveikatą. Dirvožemio cheminė sudėtis, drėgmė ir organinės medžiagos keičia dirvožemio pH vertę, todėl tai turi įtakos maistinių medžiagų prieinamumui ir metalų toksiškumui. Esant krašutinėms pH vertėms, mikroorganizmai savo citoplazmoje naudoja protonų perdavimo sistemas, kad išlaikytų osmosinę pusiausvyrą, kontroliuotų medžiagų apykaitą ir ląstelių gyvybingumą [183]. Kai kurios mikroorganizmų gentys, tokios kaip *Azospirillum*, *Pseudomonas* ir *Bacillus*, gali paveikti dirvožemio mikroelementų prieinamumą tirpindami, sudarydami chelatus, vykdydami oksidacijos redukcijos reakcijas ir pakeisdami dirvožemio pH, rūgštindami aplinką ir slopindami kitus mikroorganizmus. Saulės spindulių poveikis dirvožemio paviršiui gama ir ultravioletiniais spinduliais gali sukelti DNR mutacijas mikroorganizmuose arba jų žūtį. Esant dideliame šviesos intensyvumui, kai kurie mikroorganizmai, tokie kaip *Bacillus* ir *Serratia*, yra pigmentuoti, kurie filtruoja spinduliuotę ir apsisaugo nuo DNR pažeidimo [181, 184].

Rūgščiuose dirvožemiuose susidaro palankesnės sąlygos grybams, o šarminiuose dirvožemiuose daugiau dominuoja bakterijos. Maža dirvožemio drėgmė daugiausiai turi neigiamos įtakos bakterijoms, kita vertus, grybų sporos yra atsparesnės ir ilgiau išgyvena neaktyvioje būsenoje. Esant žemai dirvožemio drėgmei mikroorganizmai kaupia aminorūgštis, sumažindami vandens potencialą išvengia dehidratacijos ir žūties. mikoriziniai grybai modifikuoja rizosferą kaupdami glomalino baltymą, padidindami sugeriamojo paviršiaus plotą ir vandens sulaikymo pajėgumą. Didelė dirvožemio drėgmė sumažina deguonies kiekį dėl kurio sumažėja dirvožemio redokso potencialas ir organinių medžiagų mineralizacija, todėl sumažėja mikroorganizmų biologinė įvairovė [185]. Abiotinių veiksnių sukelti augalų metabolizmo, šaknų eksudatų sudėties ir rizosferos aplinkos pokyčiai gali neigiamai paveikti inokuliaciją ir sudaro būtinybę naudoti pakartotinės inokuliacijos metodus. Naudinga AASM ir augalų sąveika reikalauja, kad mikroorganizmai galėtų panaudoti šaknų eksudatus šaknų kolonizavimui, gebėtų greitai daugintis, konkuruoti su vietiniu mikrobiomu ir prisitaikyti prie aplinkos pokyčių [186].

Kad išgyventų stresinėje aplinkoje ir skatinti augalų augimą, mikroorganizmai sukūrė keletą mechanizmų. Kai kurie išgyvena žemoje ir

aukštoje temperatūroje (psichrofilai ir termofilai), druskingomis sąlygomis (halofilai) ir rūgštinėmis bei šarminėmis sąlygomis (acidofilai ir alkalofilai). Ląstelės sienelės modifikacija, metabolinių reakcijų ir genų raiškos pasikeitimas taip pat yra mechanizmai moduliuojantys atsaką į aplinkos stresą. Kvorumo jutimas yra ryšio sistema, leidžianti kolonizuoti šeiminingą ir išgyventi mikroorganizmams streso sąlygomis. Tai apima tarpląstelinį signalizavimą ir mikroorganizmų populiacijos reguliavimą [187].

Inokuliacijos metodai įveda AASM į augalų šeiminingą ir daro įtaką mikroorganizmų populiacijų įsitvirtinimui ir išlikimui rizosferoje bei jų augimą skatinančiam poveikiui. Inokuliacija turėtų būti atliekama kuo arčiau rizosferos, nes tam tikra prasme mikroorganizmai negali judėti iš inokuliacijos vietos į rizosferą. Taip yra todėl, kad mikroorganizmai paprastai nėra labai jautresni dirvožemyje. Po inokuliacijos mikroorganizmų populiacijos sumažėjimas gali būti susijęs su sunkumais prisitaikant prie naujos aplinkos [188]. Kai kurie abiotiniai ir biotiniai veiksniai turi įtakos mikroorganizmų bendrijų struktūrinei ir funkcinei įvairovei, todėl būtina įvertinti ir atrinkti mikroorganizmus iš konkrečiai vietai būdingų augalų asociacijų [189].

Mikroorganizmų inokuliacija gali būti atliekama su viena mikroorganizmo rūšimi (monoinokuliacija) arba su daugiau nei viena mikroorganizmų rūšimi vadinama koinokuliacija (mišrioji inokuliacija). Koinokuliacijos metu mikroorganizmai sąveikauja sinergiškai, padidindami inokuliacijos efektyvumą [190]. Lopes ir kt. (2018 m.) tyrime, kuriame buvo lyginamas atskiras *Pseudomona fluoresces* ir *Burkholderia pyrrrocinia* inokuliacijos ir bendras šių mikroorganizmų koinokuliacijos, nustatyta, kad šie AASM inokuliuoti kartu paskatino *Brachiaria brizantha* šaknų vystymąsi bei paskatino jų augimą ir produktyvumą. Teigiami rezultatai, gauti naudojant koinokuliaciją, išryškina papildomų tyrimų svarbą, siekiant išsiaiškinti mikroorganizmų sąveiką, numatant mišrių inokuliantų gamybą kaip didesnės mikrobiologinės biotechnologijos sėkmės alternatyvą [191].

Augalų inokuliacijai naudingais mikroorganizmais naudojami įvairūs metodai, įskaitant sėklų, šaknų, dirvožemio ir lapų inokuliaciją su AASM. Rečiausiai naudojamas inokuliacijos metodas per lapus, o dažniausiai – per sėklas. Nepaisant to, šaknų eksudatų sudėties ir kiekio kitimas augalų vegetacijos metu, o taip pat aplinkos abiotiniai ir biotiniai veiksniai gali turėti įtakos mikroorganizmų inokuliantų pritaikymo sėkmei. AASM inokuliantų naudojimas yra potenciali priemonė, padedanti padidinti augalų augimą ir pasėlių derlių tvaresniu būdu, sumažinant cheminių ir mineralinių trąšų poreikį ir užtikrinant augalų toleranciją stresams. Inokuliacijos metodai turi didelę įtaką mikroorganizmų įsitvirtinimui ir išlikimui rizosferoje bei jų augimą skatinančiam poveikiui augalams [181, 192].

Atrankos tyrimuose rekomenduojama naudoti nesterilią dirvą bei išbandyti skirtingus inokuliavimo būdus. Atliekant atrankos eksperimentus su AASM būtina turėti informacijos apie tikslinio augalo aplinkos sąlygas, kuriomis jis bus auginamas. Be to, kadangi AASM priklauso nuo augalo teikiamų eksudatų, o tai turi įtakos sudarant specifinį ryšį, idealus tyrimų scenarijus yra atrankos testuose naudoti mikroorganizmus izoliuotus iš šių augalų rizosferos natūraliose aplinkos sąlygose [193].

Ateities mikroorganizmų taikymo perspektyvos turi apimti atrankos metodų tobulinimą, pvz., antioksidacinių fermentų kiekybinį nustatymą ar kitus metodus, kurie gali būti naudingi augalų vystymuisi. Be to, atrankos bandymai turėtų būti atliekami esant skirtingoms temperatūroms, dirvožemio maistinėms medžiagoms, drėgmei ir pH. Ateities tyrimai turi apimti patobulintus inokuliavimo metodus, išsamiai aprašant kiekvienos tiriamos augalų rūšies rizosferos mikrobiomą ir augalų bei AASM sąveikas. Tikimasi, kad ateityje bus sukurti patobulinti metodai, kurie nurodys idealų AASM mišinį, naudingą konkrečiai augalų rūšiai bei geriausią inokuliavimo metodą ir jo veikimą esant skirtingoms aplinkos sąlygoms [181, 194].

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

Disertacinio darbo skyriuje "Medžiagos ir metodai" yra pateikiamos biologinės kilmės medžiagos, reagentai, tirpalai ir substratai bei tyrimų metodai naudoti šiame darbe. Tyrimams ir eksperimentams atlikti pritaikyti klasikinės mikrobiologijos ir molekulinės mikrobiologijos, bioinformacinės analizės, molekulinės biologijos, pramoninės biotechnologijos ir augalų fiziologijos metodai. Daugelis mokslinio tyrimo metodų protokolų yra modifikuoti ir pritaikyti būtent šio tiriamojo darbo rezultatams pasiekti.

2.1. Medžiagos

2.1.1. Reagentai, tirpalai ir substratai

Visi disertacijoje naudojami reagentai ir tirpalai yra pripažintos analitinės kokybės *Merck* (Vokietija), *Sigma-Aldrich* (JAV), *AppliChem* (Vokietija), *Thermo Fisher Scientific* (JAV), *VWR Chemicals* (JAV), *Biosigma S.r.l.* (Italija), *CarlRoth* (Vokietija), *Chempur* (Lenkija) gamintojų siūlomi produktai, jei darbo eigoje nenurodyta kitaip. Substratai, naudoti tiriamajame darbe, yra natūralios kilmės medžiagos, įprastai randamos gamtoje, jei nenurodyta kitaip.

2.1.2. Biologinės kilmės medžiagos

Visi šiame darbe naudoti bakterijų kamienai yra išskirti iš Lietuvos žemės ūkio paskirties laukuose augančių skirtingų augalų šaknų rizosferos. Izoliuotų ir tyrimui atlikti pasirinktų bakterijų kamienų sąrašas pateiktas **2.1 lentelėje**.

2.1 lentelė. Tiriamajame darbe naudotų bakterijų kamienų sąrašas.

Kamienas	Apibūdinimas	Šaltinis (augalas-šeimininkas)
2020 metai		
IJAK92	<i>Bacillus</i> gentis	Paprastasis kukurūzas (lot. <i>Zea mays</i>)
IJAK41	<i>Pseudomonas</i> gentis	
IJAK17	<i>Rhodococcus</i> gentis	
IIBEI11	<i>Bacillus</i> gentis	
IIBEI19	<i>Pseudomonas</i> gentis	
IIBEI38	<i>Rhodococcus</i> gentis	
IIIDEG4	<i>Priestia</i> gentis	
IIIDEG59	<i>Pseudomonas</i> gentis	
IIIDEG40	<i>Rhodococcus</i> gentis	

2021 metai		
IJAK2	<i>Pararhizobium</i> gentis	
IJAK19	<i>Paenibacillus</i> gentis	
IJAK94	<i>Bacillus</i> gentis	
IIBEI80	<i>Pararhizobium</i> gentis	
IIBEI61	<i>Paenibacillus</i> gentis	Daržinė pupelė (lot. <i>Phaseolus vulgaris</i>)
IIBEI14	<i>Bacillus</i> gentis	
IIIDEG9	<i>Pararhizobium</i> gentis	
IIIDEG36	<i>Paenibacillus</i> gentis	
IIIDEG93	<i>Priestia</i> gentis	
2022 metai		
IJAK27	<i>Bacillus</i> gentis	
IJAK44	<i>Pseudomonas</i> gentis	
IJAK91	<i>Streptomyces</i> gentis	
IIBEI32	<i>Bacillus</i> gentis	Paprastasis kvietys (lot. <i>Triticum aestivum</i>)
IIBEI40	<i>Pseudomonas</i> gentis	
IIBEI22	<i>Streptomyces</i> gentis	
IIIDEG45	<i>Bacillus</i> gentis	
IIIDEG41	<i>Pseudomonas</i> gentis	
IIIDEG72	<i>Streptomyces</i> gentis	

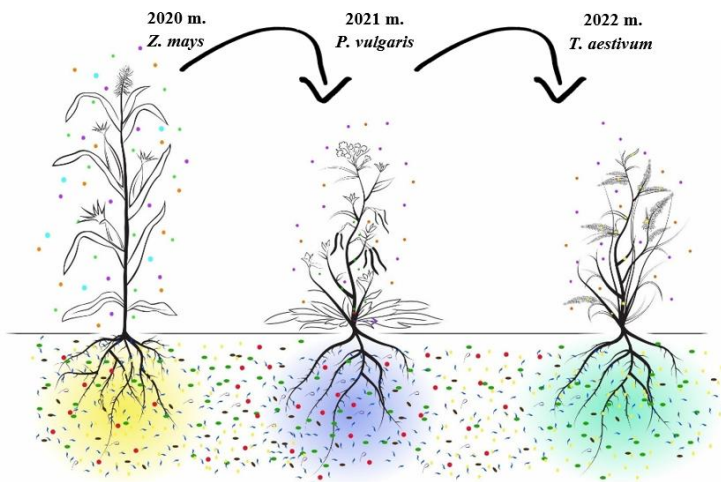
Lentelėje pateikti trys iš eilės einantys sėjomainos metai tuose pačiuose trijuose žemės ūkio paskirties laukuose bei nurodytos juose kultivuojamos augalų kultūros. Iš kultivuojamos augalų kultūros bei tolimesnių tyrimų rezultatų kiekvienais sėjomainos metais buvo atsitiktinai atrinktos labiausiai dominavusios trys skirtingos bakterijų gentys iš kiekvieno žemės ūkio paskirties lauko.

2.2. Metodai

2.2.1. Birus dirvožemio ir rizosferinio dirvožemio mėginių surinkimas

Dirvožemio mėginiai buvo surinkti 2020–2022 metais iš trijų skirtingų vietovių žemės ūkio paskirties laukų, esančių Pušaloto kaime, Pasvalio raj., Panevėžio apskr., Lietuvoje, kuriuose buvo taikyta ta pati sėjomainos technologija. Kiekvienas žemės ūkio paskirties laukas buvo užkoduotas trimis skirtingais pavadinimais: Jakuboniai (JAK), koordinatės 55°54'00.3"N 24°06'44.3"E, priskirtas neutraliems (pH 7,08) dirvožemiams; Beicarkė (BEI), koordinatės 55°55'53.6"N 24°16'46.2"E, priskirtas silpnai rūgštiesiems (pH 6,11) dirvožemiams; ir Deglėnai (DEG), koordinatės

55°56'17.8"N24°08'26.9"E, priskirtas silpnai šarminiams (pH 8,00) dirvožemiams. Pirmieji dirvožemio mėginiai iš visų trijų žemės ūkio paskirties laukų buvo surinkti 2020 metų rugsėjo mėnesį, 14 dienų prieš nuimant *Z. mays* (veislė „CRANBERRI CS“; *Lidea*, Prancūzija) derlių; sekantys dirvožemio mėginiai buvo surinkti 2021 metų rugpjūčio mėnesį, 14 dienų prieš nuimant *P. vulgaris* (veislė „FANFARE C2“; *NPZ*, Vokietija) derlių; paskutiniai dirvožemio mėginiai buvo surinkti 2022 metų rugpjūčio mėnesį, 14 dienų prieš nuimant *T. aestivum* (veislė „ARTIST C2“; *Deutsche Saatveredelung*, Vokietija) derlių (**2.1 pav.**).



2.1 pav. Sėjomainos technologija, atlikta 2020–2022 metais, trijuose skirtinguose žemės ūkio paskirties laukuose (Jakuboniai, Beicarkė, Deglėnai).

Tyrimo vietose biraus dirvožemio mėginiai buvo surinkti iš 0–20 cm gylio sluoksnio. Kiekvienas dirvožemio mėginys buvo surinktas iš septynių skirtingų taškų kiekviename žemės ūkio paskirties lauke ir sumaišytas, kad būtų gautas kompleksinis homogeniškas dirvožemio mėginys. Trys kompleksiniai biriojo dirvožemio mėginiai (1 kompleksinis dirvožemio mėginys $\times$ 3 laukai), buvo supilti į atskirus 150 mL sterilius polipropileno maišelius, užkoduoti pavadinimais JAK, BEI ir DEG bei nedelsiant transportuojami į laboratoriją dirvožemio agrocheminėms charakteristikoms atlikti [195].

Z. mays CRANBERRI CS, *P. vulgaris* FANFARE C2 ir *T. aestivum* ARTIST C2 augalų kultūros buvo naudojamos kaip modeliniai augalai norint išskirti augalų augimą skatinančias rizobakterijas iš šių augalų šaknų rizosferos dirvožemio. Iš kiekvieno pasėlio buvo išrauta po septynis kultūrinius augalus kartu su dirvožemiu aplipusiu aplink augalų šaknis ir naudojant sterilius,

užsegamus mėginių paėmimo maišelius nedelsiant nugabenti į laboratoriją tolimesniems tyrimams atlikti. Dideli dirvožemio agregatai ir ne rizosferinis dirvožemis buvo pašalinti stipriai purtant augalus. Kiekviename iš septynių augalų dirvožemis, prilipęs prie šaknų, buvo atskirai surinktas tam tikslui, kad būtų gautas kompleksinis rizosferos dirvožemio mėginys. Trys kompleksiniai rizosferos dirvožemio mėginiai (1 kompleksinis rizosferos dirvožemio mėginys $\times$ 3 laukai) buvo paimti ir užkoduoti tais pačiais pavadinimais kaip ir biraus dirvožemio mėginiai. Visi rizosferinio dirvožemio mėginiai buvo laikomi tamsioje vietoje 4 °C temperatūroje tolimesnėms analizėms atlikti [196].

2.2.2. Agrocheminė dirvožemio mėginių analizė

Surinkti biraus dirvožemio ėminiai buvo džiovinami oru termostatiname inkubatoriuje SNOL 220/300 LSN11 (SnolTherm, Lietuva) maždaug 20–25 °C temperatūroje apie 24 valandas. Išdžiovinti dirvožemio ėminiai buvo sijojami per 2 mm sietą atskiriant ir pašalinant stambesnius agregatus, o persijoti dirvožemio ėminiai kruopščiai homogenizuoti [197]. Dirvožemio ėminių vandenilio potencialas ($\text{pH}_{\text{CaCl}_2}$) buvo nustatytas elektrocheminės (potenciometrinės) analizės metodu (ISO 10390:2021) naudojant 0,01M koncentracijos CaCl_2 druskos tirpalą [198]. Kalcio chlorido tirpalas ruošiamas 1,47 g $\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$ druskos ištirpinant 1 L dejonizuoto H_2O . Homogenizuoti dirvožemio ėminiai buvo užpilami 75 mL 0,01M $\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$ tirpalu. Kalcio chlorido ir dirvožemio mišiniai kratomi 60 min. 130 aps./min. greičiu, naudojant inkubacinį purtyklę Biosan ES-20/60 (Biosan, Latvija). Sumaišyti dirvožemio ėminiai ir druskos tirpalas paliekami nusistovėti dviems valandoms. Dirvožemio pH matuotas pH elektrodu su stikliniu korpusu edge® HI2002-0 (Hanna instruments, Italija) trimis pakartojimais [198].

P_2O_5 ir K_2O buvo nustatyti naudojant Mehlich 3 (M3) ekstrakcijos metodą [199]. Mehlich 3 tirpalas susideda iš trijų pagrindinių komponentų: 0,2M CH_3COOH , 0,25M NH_4NO_3 ir 0,015M NH_4F (tirpalo pH apie 2,5). Siekiant nustatyti P_2O_5 dirvožemio mėginiai pirmiausiai buvo ekstrahuojami 5 min. naudojant Mehlich 3 tirpalą, o fosforas nustatomas fotometrinio būdu su molibdato-amonio reagentu, sukuriant fosforinio molibdato kompleksą, kurio koncentracija nustatyta pagal spalvinę reakciją, tuo tarpu K_2O buvo nustatomas naudojant liepsnos fotometriją.

Organinė anglis (C_{org}) buvo nustatyta Heraeus aparatu (Heraeus, Vokietija) deginant dirvožemio mėginius mažiausiai iki 900 °C temperatūros (ISO 10694:1995) [200]. Metodas pagrįstas $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ oksidacijos reakcija, kurią katalizuoja H_2SO_4 rūgštis. Pagrindinis proceso tikslas yra oksiduoti su

organinė anglimi susijusią medžiagą dirvožemyje, kad būtų galima nustatyti jos kiekį pagal oksidacijos metu sunaudotą kalio dichromato kiekį.

Azotas (N) buvo nustatytas Kjeldalio metodu naudojant koncentruotą H_2SO_4 rūgštį ir skaidymo katalizatorių (vario sulfatą) bei organinį N paverčiant neorganiniu amoniu (NH_4^+) [201]. Amonis (NH_4^+) distiliuojamas naudojant natrio hidroksidą (NaOH), o susidaręs amoniakas (NH_3) ištirpinamas distiliuotame vandenyje. Gautas amoniako tirpalas titruojamas naudojant HCl ir indikatorių, kuris spalvinės reakcijos metu padėtų nustatyti kiek HCl rūgšties buvo sunaudota, siekiant neutralizuoti NH_3 .

2.2.3. Augalų augimą skatinančių mikroorganizmų izoliacija

Vienas gramas dirvožemio iš kiekvieno kompleksinio rizosferos mėginio buvo sumaišytas su 9 mL sterilaus distiliuoto vandens, kuris praskiedžiamas santykiu 1:10 ir inkubuojamas purtyklėje BJPX-2102 (Biobase, Kinija) $30 \pm 0,5$ °C temperatūroje, 130 aps./min. greičiu 30 min. Pasibaigus inkubaciniam laikotarpiui, taikant serijinio praskiedimo metodą, 100 μL pradinio tirpalo buvo perkeltas į 1,5 mL mėgintuvėlį, kuriame buvo 900 μL sterilaus distiliuoto vandens, kad būtų gautas 10^{-1} praskiedimas. Serijinio skiedimo metodas buvo kartojamas iki 10^{-5} praskiedimo. Toliau po 100 μL kiekvieno praskiedimo suspensijos buvo paskleista ant LB terpės agarų lėkštelių, kurių sudėtyje buvo šie ingredientai (L^{-1}): triptonas, 10 g; mielių ekstraktas, 5 g; NaCl , 10 g; ir agaras 15 g. Terpės pH buvo sureguliuotas iki $7,0 \pm 0,2$ prieš autoklavavimą 121 °C temperatūroje 15 minučių ir po sterilizavimo proceso terpė supilstoma į sterilias Petri lėkšteles (maždaug po 20 mL į kiekvieną lėkštelę). Serijinio skiedimo suspensijos buvo paskirstytos ant atitinkamo agarų paviršiaus ir inkubuojamos 30 °C temperatūroje 24–72 valandas. Morfologiškai skirtingos kolonijos, kurios galimai buvo inicijuotos augalų augimą skatinančiomis bakterijomis, buvo pakartotinai perkeltos ir kelis kartus pagausintos ant agarizuotos LB terpės, kad būtų išgrynintos pavienės kolonijos ir inkubuojamos 30 °C temperatūroje 24–72 valandas [98, 103]. Visi tiriamajame darbe naudoti izoliatai tolimesnėms analizėms alikti buvo užšaldyti -80 °C temperatūroje naudojant 50 % glicerolio (v/v) tirpalą ir deponuoti UAB „Bioenergy LT“ įmonės kolekcijoje pavadinimu „Iš CRANBERRI CS, FANFARE C2 ir ARTIST C2 rizosferų išskirtos augalų augimą skatinančios bakterijos“.

2.2.4. Mikroorganizmų molekulinis identifikavimas ir filogenetinė analizė

Dalinė bakterijų kamienų 16S rRNR genų seka buvo amplifikuota naudojant bakterijoms būdingus universalius pradmenis: 27F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') ir 1492R (5'-ACCTTGTTACGACTT-3'). DNR fragmentų pagausinimui paruošiamas mišinys iš šių komponentų: 10× *Taq* buferinis tirpalas, pradmenys po 0,5 μM, 2 mM dNTP mišinys po 0,2 mM kiekvieno dNTP, 1 mM MgCl₂, 10 ng matricinės DNR, *Taq* polimerazės 2,5 U/100 μL reakcijos mišinio ir vandens iki 100 μL. Paruošti mišiniai patalpinami į termociklerį (Bio-Rad Laboratories, JAV). Naudotos tokios amplifikacijos sąlygos: pradinė denatūracija 5 min. 94 °C temperatūroje, 35 denatūravimo ciklai 30 sek. 94 °C temperatūroje, kaitinimas 30 sek. 58 °C temperatūroje, pratęsimas 30 sek. 72 °C temperatūroje ir galutinis pratęsimas 7 min. 72 °C temperatūroje. Po reakcijos iki analizės mėginiai laikomi 4 °C temperatūroje. Gauti DNR fragmentai analizuojami DNR elektroforezės agaroziniame gelyje.

DNR fragmentų vizualizacijai elektroforezės būdu (Maxi Horizontal Electrophoresis System, Thistle Scientific, Škotija) atlikti naudojamas horizontalus 1 % agarozinis gelis (SIGMA®). Agarozės gelis užpilamas 1× TAE buferiniu tirpalu (40 mM Tris-acetatas, 0,1 mM EDTA, pH 8,3) ir virinamas keletą minučių, kol tampa homogeniškas ir skaidrus, o tada vėsinaamas iki 40-50 °C temperatūros ir įdedama etidžio bromido iki galutinės 0,5 μg mL⁻¹ koncentracijos. Palaukiama, kol agarozės tirpalas atvės ir jis išpilamas į specialią gelio formavimo sistemą su įstatytais šukomis, kurios suformuoja takelius. Sustingus agarozės geliui į šulinėlius įnešamas DNR ilgio standartų mišinys (GeneRuler DNA Ladder Mix, 100-10000 bp, Thermo Fisher Scientific, JAV) ir tiriami mėginiai. Elektroforezė atliekama esant 100 V įtampai apie 30–40 min. Pasibaigus elektroforezei gelis apšviečiamas UV šviesa, naudojant DNR Bio-Imaging System elektroforezės rezultatų fiksavimo sistemą (MiniBIS Pro, Vokietija) [103]. Analizės metu nustatyta nukleotidinė seka lyginama su NCBI GenBank duomenų bazėje esančiomis sekomis. Tarpusavio panašumų paieška ir konservatyvių sekos domenu identifikavimas atliktas naudojant NCBI BLAST ir EBI FASTA programomis.

Filogenetiniai medžiai buvo sukonstruoti remiantis 16S rRNR genų sekomis, taikant artimo jungimo (angl. *Neighbor-Joining*) metodą naudojant MEGA 11 (angl. *Molecular Evolutionary Genetics Version 11 Analysis*) programinę įrangą (Pensilvanijos universitetas, Filadelfija, JAV). Pasirinkus didžiausios sudėtinės tikimybės (angl. *Maximum Composite Likelihood*)

metodą suskaičiuoti haplotipų kitimo (evoliucijos) eigą parodantys atstumai. Filogenetinio medžio statistinis patikimumas įvertintas klasterinės analizės imčių kartojimo (angl. *bootstrap*) analizės metodu, MEGA 11 programoje pasirenkant 1000 permutacijų matricų.

2.2.5. ZymoBIOMICS® tikslinis sekos nustatymas

Rizosferos dirvožemių mėginiai buvo apdoroti ir analizuojami naudojant ZymoBIOMICS® Targeted Sequencing Service (Zymo Research, Irvinas, Kalifornija, JAV) sistemą pagal gamintojo nurodytas instrukcijas. Į bakterijų 16S ribosominės RNR genus nukreiptas sekos nustatymas buvo atliktas naudojant Quick-16S™ NGS bibliotekos paruošimo rinkinį (Zymo Research, Irvinas, Kalifornija, JAV). Bakteriniai 16S pradmenys amplifikavo 16S rRNR geno V3–V4 sritį. Šiuos pradmenis sukūrė „Zymo Research“, kad būtų užtikrinta geriausia 16S geno aprėptis, išlaikant aukštą jautrumą. Sekoskaitos biblioteka buvo paruošta naudojant naujovišką bibliotekos paruošimo procesą, kurio metu buvo atliekamos realiojo laiko PGR, siekiant kontroliuoti ciklus ir taip apriboti PGR chimerų susidarymą. Galutiniai PGR produktai buvo kiekybiškai įvertinti naudojant kiekybinės PGR fluorescencijos rodmenis ir sujungti pagal vienodą moliškumą. Galutinė sujungta biblioteka buvo išvalyta naudojant Select-a-Size DNA Clean & Concentrator™ (Zymo Research, Irvinas, Kalifornija, JAV), tada kiekybiškai įvertinta naudojant TapeStation® (Agilent Technologies, JAV) ir Qubit® (Thermo Fisher Scientific, JAV).

ZymoBIOMICS® mikroorganizmų bendruomenės standartas (Zymo Research, JAV) buvo naudojamas kaip teigiama kiekvienos DNR ekstrakcijos kontrolė. ZymoBIOMICS® mikroorganizmų bendruomenės DNR standartas buvo naudojamas kaip teigiama kiekvieno tikslinio bibliotekos paruošimo kontrolė. Taip pat buvo įtraukta neigiama kontrolė (t.y. tuščioji ekstrahavimo kontrolė). Galutinė biblioteka buvo sekvenuota Illumina® MiSeq™ naudojant v3 reagentų rinkinį (600 ciklų). Sekoskaita buvo atlikta naudojant 10 % PhiX *spike-in*.

Unikalūs amplikonų sekų variantai buvo nustatyti iš neapdorotų skaitymų naudojant „DADA2 pipeline“ algoritmą. Galimos sekos klaidos ir chimerinės sekos taip pat buvo pašalintos naudojant „DADA2 pipeline“. Taksonomijos priskyrimas buvo atliktas naudojant Uclust (angl. *Universal Clustering*) iš Qiime v.1.9.1 (angl. *Quantitative Insights Into Microbial Ecology*) programinės įrangos su Zymo tyrimų duomenų baze. Kompozicijos vizualizacija atlikta naudojant Qiime v.1.9.1 (University of Colorado at Boulder, JAV) programinę įrangą.

2.2.6. Izoliuotų mikroorganizmų kamienų charakterizavimas

Tikslinių izoliuotų mikroorganizmų charakterizavimas buvo naudojamas siekiant nustatyti bakterijų rūšis, savybes, biologinę reikšmę ir galimą pritaikymą žemės ūkyje. Izoliuotų skirtingų bakterinių kamienų charakterizavimas buvo atliktas taikant įvairias žemiau pateiktas metodikas, kurios leido įvertinti funkcinę mikroorganizmų savybes.

2.2.6.1. Amoniakų (NH_3) išskyrimo nustatymas

Tyrimo metu bakterinių izoliatų gebėjimas išskirti NH_3 buvo nustatytas naudojant peptono vandens sultinį, kuriame buvo panaudotos šios sudedamosios dalys L^{-1} : peptonas 10,0 g ir NaCl 5,0 g; pH $7,2 \pm 0,2$; sterilizacija 121°C temperatūroje 15 min. Po vieną mililitrą kiekvienos bakterijų suspensijos (apie $1,0 \times 10^7$ kolonijas formuojantys vienetai mililitre, KfV mL^{-1}) buvo įnešta į 10 mL peptono vandens sultinio ir inkubuojama purtyklėje 30°C temperatūroje, 130 aps./min. greičiu 48 valandas. Po inkubacinio laikotarpio į kiekvieną mėginį buvo papildomai pridėta 0,5 mL Nesslerio reagento. Nesslerio reagentas ruošiamas į stiklinį indą įpylus 100 mL 40 % KOH tirpalo, įbėrus 1 g gyvsidabrio chlorido (HgCl_2) ir viską sumaišius, kol pilnai ištirpsta, o tuomet į mišinį įmaišoma 10 g kalio jodido (KI). Paruoštas Nesslerio reagentas reaguodamas su amoniaku formuoja kompleksinę jungtį $[\text{Hg}(\text{NH}_3)_2]^{2+}$, kurios metu atsiradusi spalva priklauso nuo susidariusio amoniako koncentracijos tirpale gali būti nuo šviesiai geltonos iki ramsiai rudos spalvos [166].

2.2.6.2. Vandenilio cianido (HCN) gamybos nustatymas

Po 100 μL kiekvienos izoliuotos mikroorganizmų suspensijos (apie $1,0 \times 10^7$ KfV mL^{-1}) buvo užnešama ant LB agaro lėkštelių. Bakterijų suspensijos terpės agaro paviršiuje buvo tolygiai išsklaidytos Drigalskio mentele. Whatman filtravimo popierius buvo mirkomas 2 % natrio karbonato (Na_2CO_3) tirpale, džiovinamas ir po to prisotintas 0,5 % pikrino rūgšties ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}(\text{NO}_2)_3$) tirpalu, uždėtas ant viršutinių Petri lėkštelių dangtelių bei užsandarintas orui nepralaidžia ir elastinga *Parafilm* sandarinimo plėvele. Užsandarintos lėkštelės buvo inkubuojamos 30°C temperatūroje 48 valandas. Spalvos pokyčiai filtravimo popieriuje nuo rusvos iki ryškiai raudonos spalvos buvo laikomi HCN susidarymo požymiu.

2.2.6.3. Sideroforų gamybos nustatymas

Sideroforų susidarymui nustatyti buvo naudojama Chrome Azurole (CAS) agarų terpė ir paruošimo eiga atlikta pagal gamintojo nurodytą instrukciją. Pirmiausiai buvo ruošiamas CAS tirpalas, kurio gamyba susideda iš trijų skirtingų etapų. Pirmojo etapo metu į 100 mL distiliuoto H₂O pridėta 27,0 mg FeCl₃ × 6H₂O ir 83,3 µL konc. HCl. Antrojo etapo metu į 50 mL distiliuoto H₂O įdėta 60,5 mg Chrome Azurol ir viskas kruopščiai išmaišyta. Trečiojo etapo metu į 40 mL distiliuoto H₂O įdėta 72,9 mg heksadeciltrimetilamonio bromido (HDTMA) ir viskas taip pat kruopščiai išmaišyta. Paruošus šiuos tris atskirus tirpalus į 50 mL Chrome Azurol tirpalo (antras etapas) pridėta 10 mL paruošto FeCl₃ × 6H₂O tirpalo (pirmas etapas) ir 40 mL HDMA tirpalo (trečias etapas). Bendras tirpalo tūris turi sudaryti 100 mL, o tirpalo spalva tampa tamsiai mėlyna. Bazinės agarų terpės paruošimo metu į 830 mL distiliuoto H₂O pridėta 30,0 g 3-(N-morfolino) propano sulfoninės rūgšties (MOPS), 0,5 g NaCl, 0,3 g KH₂PO₄, 0,10 g NH₄Cl, 5 g L-asparagino ir 15 agarų; pH pakoreguojamas iki 6,8 naudojant 1M NaOH. Terpė išpilstoma po 220 mL į 500 mL borosilikatinio stiklo butelius. Gliukozės tirpalo (50 %) paruošimo metu į 50 mL distiliuoto H₂O po truputį beriant ir šildant pridėta 25 g gliukozės. Tirpalas maišomas kol reikiamas gliukozės kiekis pilnai ištirpsta ir nelieta nuosėdų.

CAS tirpalas, bazinė agarų terpė ir 50 % gliukozės tirpalas autoklavuojami 121 °C temperatūroje 30 min. Po autoklavavimo visi trys tirpalai atvėsunami iki 50 °C temperatūros. Į 220 mL bazinę agarų terpę įpilama 5 mL 50 % gliukozės tirpalo, tolygiai sumaišoma ir pridedama 25 mL indikatorinio CAS tirpalo, kuris lėtai pilamas palei buteliuko stiklo sienelę, kad nesusidarytų oro burbuliukai bei atsargiai sumaišoma. Paruošta terpė išpilstoma į steriles vienkartines Petri lėkšteles.

Augalų augimą skatinantys mikroorganizmai buvo užsėti ant CAS agarų terpės lėkštelių taškinės inokuliacijos metodu ant terpės užnešus po 100 µL kiekvieno izoliato ląstelių suspensijos (apie $1,0 \times 10^7$ KfV mL⁻¹). Lėkštelės po inokuliacijos inkubuojamos 30 °C temperatūroje 7 paras. Praėjus inkubacijos periodui aplink užneštą izoliatų suspensiją susiformavusi oranžinė ar raudona skaidri zona žymi sideroforų susiformavimą.

2.2.6.4. 1-aminociklopropan-1-karboksilato (ACC) deaminazės gamybos nustatymas

ACC deaminazės aktyvumas buvo kokybiškai nustatytas naudojant pagal gamintojo nurodytą instrukciją paruoštą minimalios druskų koncentracijos DF

terpę (Dworkin ir Foster), kurioje buvo panaudotos šios sudedamosios dalys (L^{-1}): gliukozė 10,0 g; $(NH_4)_2SO_4$ 2,0 g; $MgSO_4$ 0,5 g; K_2HPO_4 1,0 g; Tris (hidroksimetil)amino metanas 20,0mM; EDTA 0,1 g ir agaras 15,0 g; sterilizacija 121 °C temperatūroje 15 min. Po sterilizacijos proceso terpė buvo išpilstyta į sterilias Petri lėkšteles. Naudojant serijinių skiedimų metodą buvo atlikti reikiami skiedimai (nuo 10^{-2} iki 10^{-6}) ir kiekvienos izoliuotos mikroorganizmų suspensijos reikiamo skiedinio 100 μL kiekis buvo perkeltas į Petri lėkšteles su agarizuota mitybine terpe bei tolygiai paskleistas Drigalskio mentele. Lėkštelės inkubuotos termostate 30 °C temperatūroje 48–72 valandas. Po inkubacijos periodo kultūrų kolonijos buvo dar kartą perkeltos pakartotinai į lėkšteles su agaru, kuriose buvo ta pati DF terpė, tačiau joje vietoje $(NH_4)_2SO_4$, kaip vienintelio azoto šaltinio, buvo naudotas ACC. Pakartotinai užsėtos lėkštelės buvo inkubuojamos 30 °C temperatūroje 7 paras [159, 179]. Buvo laikoma, kad augalų augimą skatinantys izoliatai, kurie gebėjo augti terpėje, kurios kompozicijoje buvo ACC kaip vienintelis azoto šaltinis, turi teigiamą ACC deaminazės aktyvumą.

2.2.6.5. Katalazės aktyvumo nustatymas

Katalazės fermento aktyvumui nustatyti ant švaraus mikroskopinio stiklelio inokuliacinės kilpelės pagalba buvo užlašintas bakterijų suspensijos lašas (apie $1,0 \times 10^7$ KfV mL^{-1}) ir į suspensiją papildomai įlašinamas 1 lašas 3 % vandenilio peroksido (H_2O_2). Dujų burbuliukų susidarymas ant mikroskopinio stiklelio mišinio buvo laikomas teigiamu katalazės fermento susidarymo požymiu.

2.2.6.6. Azoto fiksavimo aktyvumo nustatymas

Biologinės azoto fiksacijos aktyvumas buvo kokybiškai įvertintas naudojant pagal gamintojo nurodytą instrukciją paruoštą GNFM (angl. *Glucose Nitrogen-Free Mineral medium*) agarizuotą terpę, taip pat naudojant bromtimolio mėlynąjį (BTB) kaip indikatorių. Terpės sudėtį sudarė šie ingredientai (L^{-1}): gliukozė, 10,0 g; K_2HPO_4 , 1,0 g; $MgSO_4$, 0,2 g; NaCl, 0,2 g; $CaCO_3$, 1,0 g; Na_2MoO_4 , 0,005 g; $FeSO_4$, 0,1 g; ir agaras, 20 g; terpės pH buvo sureguliuotas iki $7,0 \pm 0,2$ ir sterilizuojama 121 °C temperatūroje 15 min. BTB buvo paruoštas ištirpinant 0,5 g BTB 100 mL distiliuoto vandens ir sterilizuotas filtruojant pro 0,2 μm politetrafluoroeteno (PTFE) filtrą. Kiekvieno izoliato suspensija (apie $1,0 \times 10^7$ KfV mL^{-1}) buvo pasėta ant GNFM agaro lėkštelių paviršiaus ir inkubuojama 28 °C temperatūroje 7 paras. Po inkubacijos periodo lėkštelės buvo užpilamos BTB tirpalu. Spalvos

pokyčiai aplink bakterijų kultūras nuo žalios iki tamsiai mėlynos spalvos parodė izoliatus, galinčius turėti azoto fiksavimo potencialą.

2.2.6.7. Kalio junginių tirpinimo efektyvumo nustatymas

Izoliuotų mikroorganizmų suspensijos (apie $1,0 \times 10^7$ KfV mL⁻¹) taškinio inokuliacijos metodu buvo užsėtos ant, pagal gamintojo nurodytą instrukciją paruoštos, Aleksandrow agarų terpės paviršiaus, susidedančios iš šių ingredientų (L⁻¹ distiliuoto vandens): dekstrozė, 5,0 g; CaCO₃, 0,1 g; FeCl₃, 0,005 g; MgSO₄ × 7H₂O, 0,5 g; Ca₃PO₄, 2,0 g; kalio aliuminio oksido silikatas, 2,0 g; ir agaras, 20,0 g; terpės pH prieš sterilizavimą buvo sureguliuotas $7,2 \pm 0,2$ ir autoklavuojama 121 °C temperatūroje 15 min. Lėkštelės su paruošta ir užsėta terpe buvo inkubuojamos 30 °C temperatūroje 7 paras. Praėjus nurodytam inkubaciniam periodui buvo analizuojamas bakterijų izoliatų gebėjimas ištirpinti kalio junginius, remiantis aiškių skaidrių zonų atsiradimu aplink susiformavusias izoliatų kolonijas.

2.2.6.8. Fosfatinių junginių tirpinimo efektyvumo nustatymas

Fosfatinių junginių tirpinimo efektyvumas buvo nustatytas naudojant pagal gamintojo nurodytą instrukciją paruoštą Pikovaskaya's (PVK) agarų terpę, kurią sudarė šie ingredientai (L⁻¹ distiliuoto vandens): mielių ekstraktas, 0,50 g; dekstrozė, 10,00 g; Ca₃(PO₄)₂, 5,00 g; (NH₄)₂SO₄, 0,500 g; KCl, 0,20 g; MgSO₄, 0,10 g; MnSO₄, 0,0001 g; FeSO₄, 0,0001 g; ir agaras, 15,00 g; terpės pH buvo sureguliuotas iki $7,0 \pm 0,2$ prieš autoklavavimą 121 °C temperatūroje 15 min. Kiekvienas izoliatas buvo užsėjamas ant PVK agarų lėkštelių inokuliacinės kilpelės pagalba, o užsėtos lėkštelės buvo inkubuojamos 30 °C temperatūroje 7 paras. Skaidrių zonų susidarymas aplink izoliuotų mikroorganizmų kolonijas po inkubacijos laikotarpio parodė teigiamą fosfatinių junginių tirpinimo efektyvumo rezultatą.

2.3. Kiekybinis fosfatų tirpinimo aktyvumo įvertinimas

Kiekybinis neorganinio fosfato tirpinimo įvertinimas atliktas modifikuotos receptūros skystoje NBRIP (angl. *National Botanical Research Institute's phosphate growth medium*) terpėje [202]. Trikalčio fosfatas (Ca₃(PO₄)₂) maistinėje terpėje buvo pakeistas natūralia iškastine fosfatinė uoliena iš Maroko kaip vieninteliu netirpiu fosfatinio šaltiniu. Mikroorganizmų suspensijos prieš inokuliaciją į šią terpę buvo paruoštos užsėjant izolatus į skystos fazės LB terpę ir inkubuojamos 30 °C temperatūroje, 130 aps./min. 16–20 valandų. Vienas mililitras paruoštos izoliato suspensijos (apie $1,0 \times 10^7$

KFV mL⁻¹) arba dviejų ar trijų izoliatų mikroorganizmų suspensijų mišinys lygiomis dalimis (apie $1,0 \times 10^7$ KFV mL⁻¹) buvo pasėtas į 100 mL modifikuotą NBRIP terpę ir inkubuojamas 30 ° C temperatūroje, 130 aps./min. greičiu 30 parų. Kaip kontrolinis mėginys buvo paruošta skysta modifikuota NBRIP terpė be jokio mikroorganizmų inokuliavimo. Po 30 parų inkubacinio periodo suspensijos buvo centrifuguojamos šaldančioje centrifugoje 10 000 × g greičiu 30 minučių, kad būtų pašalintos suspensijose esančios netirpios nuosėdos ir ląstelių biomasė. Tirpus fosforas (P, mg L⁻¹) mėginiuose buvo nustatytas spektrometriniu metodu, matuojant optinį tankį esant bangos ilgiui 850 nm (OT_{850nm}) bei naudojant amonio molibdatą (NH₄)₂MoO₄, kuris reaguodamas su fosfatais sukuria spalvotą kompleksą. Spektrometriniu būdu matuojamas susidaręs spalvos intensyvumas yra tiesiogiai proporcingas fosforo koncentracijai mėginyje. Kiekvieno mėginio analizė atlikta trimis pakartojimais.

2.4. Mitybinės terpės maistinių medžiagų sudėties ir kontroliuojamų augimo parametrų optimizavimas

Mitybinės terpės maistinių medžiagų sudėties ir kontroliuojamų augimo parametrų laipsniškas koregavimas buvo atliktas siekiant stebėti ir optimizuoti mikroorganizmų augimą keičiant terpės sudedamąsias dalis bei augimo parametrų diapazonus. Pirmiausiai, tyrimams atlikti buvo pasirinkta bazinė terpė, kuri yra sudaryta pagal bendras mikroorganizmų augimo ir maisto poreikių rekomendacijas. Šiems eksperimentams atlikti pasirinkta bazinė terpė modifikuota ir pritaikyta pagal šio darbo tiklą ir autoklavuojama 121 °C temperatūroje 15 min. Mitybinės terpės optimizavimas buvo pradėtas nuo pradinės terpės sudėties laipsniško koregavimo, atsižvelgiant į gaunamą mikroorganizmų augimo greitį ir biomasės kiekį. Pirmiausiai, bandymai atlikti sudarant tris pagrindines bandymų grupes, atsižvelgiant į tris pagrindinius maistinių medžiagų šaltinius. Pirmoje bandymų grupėje, kaip pagrindinis mitybinės terpės komponentas atsakingas už suteikiamą energiją mikroorganizmams, buvo pasirinktas anglies šaltinis (gliukozė, sacharozė, krakmolas, glicerolis ir melasa). Antroje bandymų grupėje, kaip mitybinės terpės komponentas atsakingas už įvairius fermentus ir biocheminius procesus, buvo pasirinktas kompleksinis organinis azoto šaltinis, savo sudėtyje taip pat turintis įvairių peptidų, baltymų, mineralų, vitaminų bei aminorūgščių (mielių ekstrakto milteliai, sojų pupelių peptonas, agropeptonas, mėsos ekstrakto milteliai ir bulvių ekstrakto milteliai). Trečioje bandymų grupėje buvo pasirinktas neorganinis azoto šaltinis, atsakingas už ląstelių augimą ir metabolizmą (KNO₃, CH₄N₂O, (NH₄)H₂PO₄, (NH₄)₂SO₄,

NH₄Cl). Kiekvienu bandymo atveju mikroorganizmai buvo užsėti į 2000 mL tūrio Erlenmejerio kolbas, kuriose buvo po 200 mL kintančios sudėties skystos fazės mitybinės terpės. Mikroorganizmais užsėtos kolbos inkubuojamos 30 °C temperatūroje, 130 aps./min. greičiu 48 valandas [98].

Sudarius optimalią kiekvieno mikroorganizmo/-ų auginimo terpės sudėtį, tolimesni eksperimentai atlikti su kontroliuojamais augimo parametrais. Pirmiausiai optimizavimui pasirinkta inkubacijos temperatūra su 20–40 °C laipsnių diapazonu ir 5 °C intervalais. Pasirinkus tinkamiausią temperatūrą buvo optimizuojama terpės pH vertė su 6,0–8,0 diapazonu ir 0,5 intervalais (prieš sterilizavimo procesą) [105]. Mitybinės terpės maistinių medžiagų sudėties ir kontroliuojamų augimo parametrų optimizavimo bandymai buvo atlikti trimis pakartojimais. Analizė atlikta VR-2000 spektrofotometru naudojant optinį tankį esant 600 nm bangų ilgiui (OT₆₀₀) ir taikant serijinį skiedimo metodą įvertinant KfV mL⁻¹.

2.5. Biologinių fermentacijos procesų optimizavimas

Biologinių fermentacijos procesų optimizavimas buvo atliekamas naudojant laboratorinį bioreaktorių EDF 5.4_1 (Bioreactors.net AS, Ryga, Latvija), kurio bendras tūris yra iki 5,4 L. Fermentacijos procesų mitybinės terpės sudėtis ir augimo parametrai buvo parinkti pagal mitybinės terpės maistinių medžiagų sudėties ir kontroliuojamų augimo parametrų optimizavimo eksperimentų metu gautus rezultatus.

Laboratorinio bioreaktoriaus indas buvo sterilizuotas 125 °C temperatūroje 60 minučių ir po autoklavavimo proceso aseptinėmis sąlygomis prijungtas prie pagrindinio bioreaktoriaus valdymo bloko. Bioreaktoriaus valdymo ekrane nustatyti visi kontroliuojami fermentacijos proceso parametrai: maišyklės apsisukimų greitis per minutę (aps./min.), dalinis deguonies slėgis (pO₂), oro srautas (L/min.), temperatūra (°C) ir pH vertė. Naudotos trys specialiai bioreaktoriui paruoštos sterilių sistemų su silikoninėmis žarnelėmis, o šiose sistemose buvo šarminis tirpalas (2M NaOH), rūgštinis tirpalas (2M H₂SO₄) ir silikono pagrindo antiputokšlis Lucrafoam 1573 (LEVACO Chemicals GmbH, Kelnas, Vokietija). pH vertė buvo kontroliuojama dviem peristaltiniais siurbliais, kurie silikoninių žarnelių pagalba automatiškai dozavo 2M H₂SO₄ arba 2M NaOH tirpalus tiesiai į bioreaktoriuje esančią mitybinę terpę. Susidaręs putų lygis buvo registruojamas per laidumo jutiklį, kuris buvo sumontuotas bioreaktoriaus indo viršutiniame dangtyje. Pasiekus maksimalų putojimo lygį, priskirtas peristaltinis siurblys automatiškai dozavo antiputokšlį iki kol putų lygis sumažėdavo iki optimalaus lygio. Dalinis deguonies slėgio lygis buvo

palaikomas pagal kaskadinį algoritmą, kuris veikė dviem valdymo principais, t. y. pirmiausiai buvo reguliuojamas maišymo greitis (nuo 100 iki 800 aps./min.) ir galiausiai įleidžiamas oro kiekis, kuris įsotino mitybinę terpę deguonimi. Viso fermentacijos proceso metu dujų srautas buvo palaikomas 2 standartiniais litrais per minutę (angl. *Standard Liters Per Minute, SLPM*).

Viena iš sterilių sistemų buvo prijungta prie peristaltinio siurblio ir jo pagalba sterili mitybinė terpė ir mikroorganizmo ląstelių suspensija (apie $1,0 \times 10^7$ KfV mL⁻¹) arba mikroorganizmų ląstelių suspensijų mišinys lygiomis dalimis (apie $1,0 \times 10^7$ KfV mL⁻¹) laminarinėje traukos spintoje aseptinėmis sąlygomis buvo suduzuota į bioreaktoriaus indą. Pradėjus fermentacijos procesą į bioreaktoriaus ertmę aplink pagrindinį reaktoriaus indą buvo tiekiamas vanduo, norint išlaikyti reikiamą fermentacijos proceso temperatūrą.

Fermentacijos procesų metu kas 3 fermentacijos valandas buvo surinkti ląstelių suspensijų mėginiai, siekiant nustatyti ląstelių biomasės kiekį ir gliukozės koncentracijos kitimą. Biomasės mėginiai buvo surinkti aseptiškai, kad būtų galima matuoti ląstelių koncentraciją ar metabolitus. Biomasės koncentracija buvo nustatyta matuojant optinį tankį esant 600 nm bangos ilgiui (OT_{600nm}), naudojant VR-2000 spektrofotometrą (J.P. SELECTA, Barselona, Ispanija). Gliukozės koncentracija fermentacijos mėginiuose metu buvo nustatyta naudojant 2900 Biochemistry Analyzer analizatorių (YSI Inc., Veilheimas, Vokietija). Analizėse kaip kontrolinis mėginys buvo naudojama mitybinė terpė be ląstelių kultūrų.

Biologinių fermentacijos procesų pabaiga nustatyta naudojant mikroskopinę analizę mikroskopu 3000A-B LED (Comecta, Ispanija) ir stebint fermentacijos proceso parametrų tendencijų pokyčius. Fermentacijų mėginiai buvo surenkami į 500 mL sterilius indus ir laikomi 4 °C temperatūroje tolimesniems tyrimams atlikti.

2.6. Organinių rūgščių analizė naudojant skysčių chromatografiją-masių spektrometrija (LC-TOF/MS)

Surinkti fermentacijos mėginiai buvo centrifuguojami 10 min. $4200 \times g$ greičiu. Gautas supernatantas praskiedžiamas acetonitrilu (santykiu 1:1). Apatinė frakcija surenkama ir praskiedžiama vandeniu santykiu 1:3. Gautas tirpalas filtruojamas per 0,45 μm PTFE filtrus ir analizuojamas HPLC-MS. Organinių rūgščių koncentracija buvo nustatyta naudojant Agilent 6230 TOF LC/MS sistemą (Agilent Technologies, Waldbronn, Vokietija) su elektropurškimo jonizacija (ESI). Chromatografinis atskyrimas buvo atliktas Phenomenex Rezex ROA-Organic Acid H⁺ (8 %) kolonėlėje (150 × 4,6 mm),

kuri buvo inkubuota 55 °C temperatūroje. Naudotas izokratinis 0,5 % (v/v) vandeninės skruzdžių rūgšties eliuavimas 0,30 mL min⁻¹ srauto greičiu. Įpurškimo tūris buvo 2 µL. ESI-MS buvo atliktas neigiamos jonizacijos režimu su tokiais nustatymais: fragmentoriaus įtampa, 75 V; džiovinimo dujų srautas, 10,0 L min⁻¹; džiovinimo dujų temperatūra, 285 °C; kapiliarinė įtampa, 3500 V; purkštuvo slėgis, 40 psi. Visas skenavimo masės diapazonas buvo 50–1100 *m/z*. Naudotos vidinės atskaitos masės 112,9856 *m/z* ir 1033,9881 *m/z*. Matavimai buvo atlikti trimis pakartojimais. Visi duomenys buvo apdoroti naudojant MassHunter 7.00 programinę įrangą (Agilent Technologies, Waldbronn, Vokietija) [70, 71]. Organinių rūgščių koncentracija mėginiuose buvo nustatyta pagal sudarytas standartines kreives.

2.7. Fitohormonų analizė naudojant skysčių chromatografiją-masių spektrometrija (LC-TOF/MS)

Mėginių paruošimo metodas buvo pritaikytas Castillo ir kt. [203]. Mėginiai buvo centrifuguojami 13 000 × *g* greičiu 10 min., o po to supernatanto alikvotinė dalis (3 mL) buvo sureguliuota iki pH 2–3 su 3M HCl. Gautas mišinys buvo ekstrahuotas 3 mL etilo acetato, purtant 5 minutes 130 aps./min. greičiu ir centrifuguojamas 4200 × *g* greičiu 5 minutes. Ekstrahavimas buvo pakartotas tris kartus. Sujungta etilo acetato frakcija išgarinama iki sausumo azoto srove 40 °C temperatūroje ir ištirpinama 1,0 mL 20 % metanolio vandenyje, kuriame yra 0,1 % skruzdžių rūgšties. Gautas tirpalas filtruojamas pro 0,45 µm hidrofilinį filtrą ir analizuojamas naudojant LC-TOF/MS. Indol-3-acto rūgšties, zeatino, giberelino rūgšties ir abscizo rūgšties identifikavimas ir kiekybinis įvertinimas buvo atliktas naudojant Agilent 6230 TOF LC/MS sistemą (Agilent Technologies, Waldbronn, Vokietija), turinčią elektropurškimo jonizaciją (ESI). Chromatografiniam atskyrimui 40 °C temperatūroje buvo naudojama Kinetex C18 kolonėlė (3,0 × 100 mm, 2,6 µm). Judanti fazė sudaryta iš 0,1 % vandeninės skruzdžių rūgšties (A) ir 0,1 % skruzdžių rūgšties metanolyje (B). Gradientinis eliuavimas buvo atliktas tokiomis sąlygomis: 0 min., 10 % B; 2 min., 10 % B; 3 min., 30 % B; 4,5 min., 30 % B; 5,5 min., 50 % B; 8,5 min., 50 % B; 14,5 min., 70 % B; 16 min., 98 % B; 18 min., 98 % B; 19 min., 10 % B; ir 23 min., 10 % B. Srauto greitis buvo 0,2 mL min⁻¹, o injekcijos tūris buvo 20 µL. Masių spektrometro nustatymai buvo tokie: džiovinimo dujų srautas, 12 L min⁻¹; džiovinimo dujų temperatūra, 320 °C; purkštuvo slėgis, 40 psi; kapiliarinė įtampa, 3500 V; ir fragmentoriaus įtampa, 130 V. ESI-MS buvo naudojamas teigiamos jonizacijos režimu, o visas skenavimo masės diapazonas buvo 50–1000 *m/z*. Kalibravimas atliktas naudojant vidines atskaitos mases 121,0509 *m/z* ir

922,0098 *m/z*. Kiekvieno mėginio analizė buvo atlikta trimis pakartojimais. Duomenims analizuoti naudota MassHunter 7.00 programinė įranga (Agilent Technologies, Waldbronn, Vokietija). Indol-3-acto rūgšties, zeatino, giberelino rūgšties ir abscizo rūgšties kiekis mėginiuose buvo nustatytas pagal sudarytas standartines kreives.

2.8. Bendros inokuliacijos bandymas nesterilėmis sąlygomis

Augalų sėklos gautos iš Žemės ūkio bendrovės „Krekenava“, esančios Pušaloto kaime, Pasvalio raj., Panevėžio apskr., Lietuvoje. Sėklų paviršius buvo dezinfekuojamas 2 % NaClO tirpale 5 minutes, o po to 70 % etanolio tirpale dar 5 minutes. Praplovimas steriliu H₂O truko 30 sekundžių ir buvo pakartotas penkis kartus, o galutinis praplovimo vanduo buvo panaudotas dezinfekavimo kokybei įvertinti užnešant jį ant agarizuotos LB mitybinės terpės lėkštelių ir po inkubacinio 48 valandų laikotarpio 30 °C temperatūroje vertinamas kolonijas sudarančių vienetų skaičius. Iš anksto atrinktos, dezinfekuotos, sveikos bei panašaus dydžio sėklos buvo pasodintos į plastikinius vazonus (tūris = 2,5 L), kuriuose buvo du kilogramai nesterilizuoto dirvožemio, vermikulito, durpių substrato ir perlito mišinio (santykis 5:1:1:1 *v/v*). Vienas mililitras ląstelių (apie $1,0 \times 10^7$ KfV mL⁻¹) suspensijos ar buvo įneštas į kiekvieną tyrimo vazoną praėjus 7 dienoms po sėklų pasodinimo. Bendrai inokuliacijos procedūrai atlikti buvo paruoštas ląstelių suspensijų mišinys, sudarytas iš dviejų ar trijų mikroorganizmų ląstelių suspensijų mišinio lygiomis dalimis santykiu 1:1 arba 1:1:1 (apie $1,0 \times 10^7$ KfV mL⁻¹). Kaip kontrolė buvo naudojamas 1 mL skystos mitybinės terpės be bakterijų inokuliatas. Po 14 dienų buvo atlikta pakartotinė bakterinių suspensijų inokuliacija tomis pačiomis sąlygomis. Kiekvieną bandymo variantą sudarė penki pakartojimai.

Augalai buvo auginami 28 °C temperatūroje, 16:8 dienos ir nakties fotoperiodu laboratorinėje augalų augimo kameroje (NADE RGQ-360N) 55 paras. Vazonai su augalais buvo reguliariai laistomi vandentiekio vandeniu siekiant imituoti lauko sąlygas. Po 55 vegetacijos parų buvo išmatuoti augalų parametrai, įskaitant šaknies ilgį, augalo aukštį; šaknų ir viršžeminės dalies žaliąją masę bei šaknų ir viršžeminės dalies sausąją masę (džiovinant augalus 70 °C temperatūroje 48 valandas). Analizės atliktos konsultuojantis su tyrimų ir bandymų laboratorija NovaCropControl, Nijverheidsweg 30, 5061 KL Oisterwijk, Nyderlandai.

2.9. Statistinė analizė

Visi eksperimentai buvo atlikti mažiausiai trimis pakartojimais. Prieš statistinius palyginimus buvo įvertintas duomenų normalumas naudojant Shapiro–Wilk testą, o dispersijų lygybė naudojant Levene testą. Abi prielaidos buvo tenkinamos. Duomenų dispersijai apskaičiuoti buvo naudojama vienas ANOVA, o vidurkiai buvo apskaičiuoti remiantis Tukey testu ($p \leq 0,05$), naudojant GraphPad Prism 10.4.1 programinę įrangą (GraphPad Software Inc., Kalifornija, JAV).

3. REZULTATAI

3.1. Eksperimentinių plotų analizė ir meteorologinės sąlygos

Panevėžyje, Pušaloto rajone, ŽŪB „Krekenava“ buvo pasirinkti trys žemės ūkio paskirties laukai, kuriuose buvo taikyta vienoda sėjomainos ir žemės apdirbimo technologija. Atlikta šių žemės ūkio paskirties laukų bendroji apžvalga, kurioje nurodytos laukų geografinės koordinatės ir aukštis virš jūros lygio. Eksperimentinių teritorijų klimatas pagal Kepeno-Geigerio klasifikacijos sistemą (angl. *Köppen-Geiger climate classification*) buvo priskirtas prie *Dfb* tipo, kuriam būdingas drėgnas žemyninis klimatas su šiltomis vasaromis [204]. Bendri apžvalgos duomenys pateikti **3.1 lentelėje**.

3.1 lentelė. Žemės ūkio laukų geografinės koordinatės, aukštis virš jūros lygio ir klimato ypatybės.

Žemės ūkio paskirties žemė	Koordinatės ¹	Aukštis (m) ²	Klimato tipas ³
JAK	55°54'00.3" N 24°06'44.3" E	54	Dfb
BEI	55°55'53.6" N 24°16'46.2" E	41	
DEG	55°56'17.8" N 24°08'26.9" E	48	

¹Platuma, ilguma; ²virš jūros lygio; ³pagal Kepeno-Geigerio klasifikaciją.

Dirvožemių sudėtiniuose mėginiuose nustatyta, kad pirmojo žemės ūkio paskirties lauko (JAK) dirvožemio pH artimas neutraliam, t. y. 7,08. Tuo tarpu antrojo žemės ūkio paskirties lauko (BEI) dirvožemis buvo artimas silpnai rūgštiesiems dirvožemiams, kurio pH buvo 6,11, o trečiojo žemės ūkio paskirties lauko (DEG) dirvožemio pH buvo priskirtas prie silpnai šarminių dirvožemių ir jo pH vertė siekė 8,00 [198].

Lyginant organinės anglies (C_{org}) kiekius žemės ūkio paskirties dirvožemiuose nustatyta, kad žemiausia organinės anglies koncentracija nustatyta BEI dirvožemyje – 0,95 % ir tai rodo dirvožemį, kuris priskiriamas prie žemą organinės anglies kiekį turinčių dirvožemių (mažiau nei 1 %). JAK ir DEG dirvožemiuose nustatytos C_{org} reikšmės buvo 1,19 ir 2,12 %, atitinkamai, o tai rodo, kad dirvožemiai yra priskiriami prie vidutinių organinės anglies koncentracijų dirvožemių, kuriuose C_{org} reikšmė svyruoja nuo 1,0 % iki 3,0 % [205].

Sekantis analizuotas agrocheminis rodiklis buvo P_2O_5 kiekis dirvožemiuose: JAK dirvožemyje nustatyta 115 mg Kg^{-1} , BEI dirvožemio mėginyje 199 mg Kg^{-1} ir DEG dirvožemio mėginyje 159 mg Kg^{-1} . Remiantis literatūros analize, geriausias fosforo įsisavinimas (100 %) yra tada, kai dirvožemio pH yra neutralus (7,0), tuo tarpu kai dirvožemio pH svyruoja nuo 6,0 iki 6,5, fosforo įsisavinimas svyruoja nuo 52 % iki 95 %, o esant

dirvožemio pH reikšmei virš 7,5 fosforo įsisavinimas krenta nuo 70 % iki 20 %. Vertinant P_2O_5 koncentraciją pasirinktuose dirvožemiuose nustatyta, kad žemės ūkio paskirties laukas JAK, pagal vertinimo grupes žemės ūkio naudmenose, priskiriamas III grupei, kuriai priklauso vidutinę fosforo koncentraciją mineraliniuose dirvožemiuose turintys dirvožemiai (nuo 101 iki 150 $mg\ Kg^{-1}$), o kiti du dirvožemiai, BEI ir JAK, priskirti IV grupei, kurios vidutinė fosforo koncentracija mineraliniuose dirvožemiuose siekia nuo 151 iki 200 $mg\ Kg^{-1}$. Iš dalies daug fosforo turinčių dirvožemių nustatoma Panevėžio savivaldybėje – net iki 53,7 % [206].

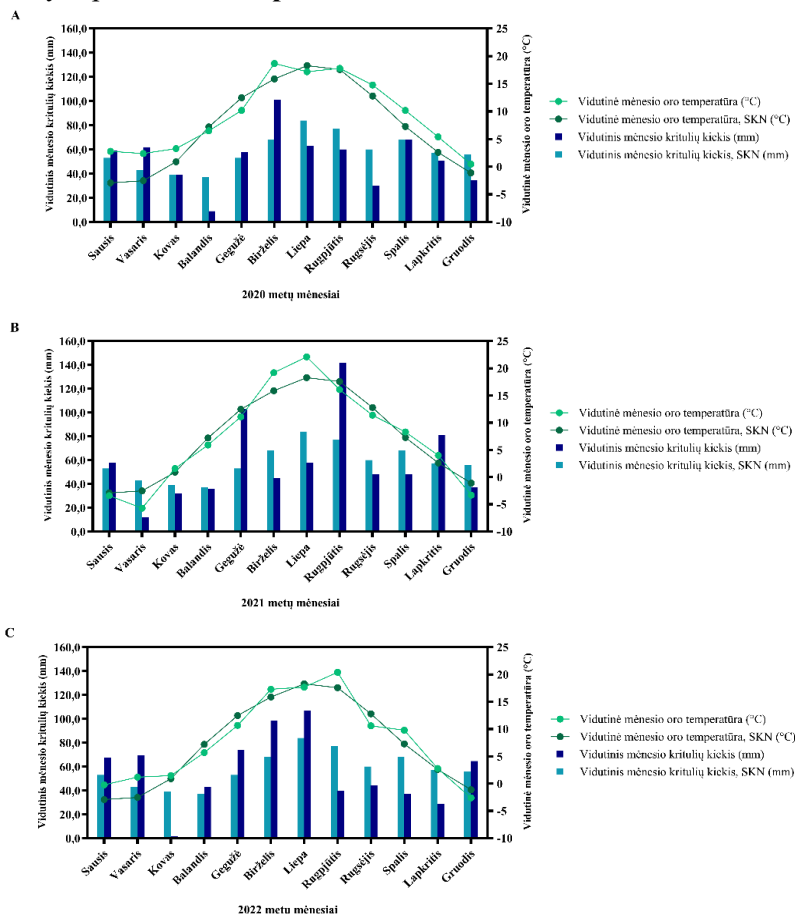
Analizuojant K_2O koncentracijas žemės ūkio paskirties laukų dirvožemiuose nustatyta, kad JAK dirvožemio mėginys turi mažiausią jo koncentraciją – 129 $mg\ Kg^{-1}$, o BEI ir DEG dirvožemio mėginiuose nustatyta koncentracija siekė 141 ir 265 $mg\ Kg^{-1}$, atitinkamai. Remiantis K_2O koncentracijos vertinimu mineraliniuose dirvožemiuose, JAK ir BEI dirvožemiai priskirti III grupei, kurioje jo koncentracija svyruoja nuo 101 iki 150 $mg\ Kg^{-1}$, o DEG dirvožemis priskirtas V grupei, kuriai priklauso labai didelę K_2O koncentraciją turintys dirvožemiai (nuo 201 iki 300 $mg\ Kg^{-1}$). Tiek laisvojo P_2O_5 , tiek laisvojo K_2O nustatyti parametrai būdingi Vidurio Lietuvos žemumai [207].

Nitratinis azotas ($N-NO_3$) dirvožemyje yra viena iš svarbiausių azoto formų augalams. Jo koncentracija tiriamuose žemės ūkio paskirties laukuose labai skyrėsi tarpusavyje: JAK – 1,43 $mg\ Kg^{-1}$, BEI – 8,32 $mg\ Kg^{-1}$ ir DEG – 15,20 $mg\ Kg^{-1}$. Mažiau nei 10 $mg\ Kg^{-1}$ $N-NO_3$ turintys dirvožemiai priklauso žemos koncentracijos dirvožemiams, kur azoto kiekis yra ribotas arba nitratai greitai išplaunami iš dirvožemio ir šiuo atveju JAK ir BEI dirvožemiai buvo priskirti būtent šiai grupei, tačiau DEG dirvožemis turėjo didžiausią $N-NO_3$ koncentraciją ir jis buvo priskirtas prie vidutinės koncentracijos dirvožemių, kuriuose $N-NO_3$ koncentracija svyruoja nuo 10 iki 30 $mg\ Kg^{-1}$. Amonio azotas ($N-NH_4$) yra kita azoto forma, kurią augalai gali pasisavinti. Visuose tirtuose dirvožemiuose nustatytas mažas $N-NH_4$ kiekis ir visi trys dirvožemiai buvo priskirti žemai $N-NH_4$ koncentracijų grupei (mažiau nei 5 $mg\ Kg^{-1}$): JAK, BEI ir DEG dirvožemiuose nustatytos koncentracijos 2,35, 0,74 ir 0,50 $mg\ Kg^{-1}$, atitinkamai. Mineralinis azotas (N_{min}) dirvožemyje apima visas augalams įsisavinamas azoto formas, t. y., nitratinį azotą ($N-NO_3$) ir amonio azotą ($N-NH_4$). Pirmieji du analizuoti dirvožemiai, JAK ir BEI, buvo priskirti prie žemos N_{min} koncentracijos grupės (mažiau nei 10 $mg\ Kg^{-1}$): 3,77 ir 9,06 $mg\ Kg^{-1}$, atitinkamai, o trečiasis tiriamasis dirvožemis DEG buvo priskirtas prie vidutinės N_{min} koncentracijos grupės (nuo 10 iki 30 $mg\ Kg^{-1}$) ir siekė 15,70 $mg\ Kg^{-1}$ [208]. Informacija apie kiekvieno žemės ūkio lauko agrocheminės analizės rezultatus pateikta **3.2 lentelėje**.

3.2 lentelė. Sudėtinių dirvožemių mėginių (0–20 cm) agrocheminės savybės.

Plotas	Gylis (cm)	pH vertė	Organinė anglis	P ₂ O ₅	K ₂ O	N-NO ₃	N-NH ₄	N _{min}
			%			mg Kg ⁻¹		
JAK	0–20	7,08	1,19	115	129	1,43	2,35	3,77
BEI		6,11	0,95	199	141	8,32	0,74	9,06
DEG		8,00	2,12	159	265	15,20	0,50	15,70

Lietuvos hidrometeorologijos tarnybos duomenys buvo panaudoti aptariant meteorologines sąlygas eksperimento vykdymo laikotarpiu 2020–2022 metais Panevėžio apskrityje. Vidutinės mėnesių paros temperatūros ir vidutiniai mėnesių kritulių kiekiai buvo lyginti su standartine klimato norma (SKN), kuri yra apskaičiuojama pagal iš eilės einančių 30 metų laikotarpio vidurkį (šiuo atveju nuo 1991 m. sausio 1 d. iki 2020 m. gruodžio 31 d.). Visi duomenys apibendrinti **3.1 pav.**



3.1 pav. Vidutinė mėnesio paros temperatūra ir kritulių kiekis eksperimentų vykdymo laikotarpiu 2020–2022 metais lygiant juos su standartinėmis klimato normomis (SKN) (1991–2020 m.) (A – 2020 metai; B – 2021 metai; C – 2022 metai). Šaltinis – www.meteo.lt.

2020 m. sausio mėn. buvo šilčiausias nuo pat 1961 m. – vidutinė mėnesio oro temperatūra Lietuvoje siekė net 2,8 °C. Tuo tarpu, 2021 m. sausio mėn. vidutinė oro temperatūra Lietuvoje siekė -3,4 °C, o 2022 sausio mėn. -0,2 °C. Pagal taikytą SKN (1991–2020 m.) tai yra 5,7 °C šilčiau; 0,5 °C šalčiau; ir 2,7 °C šalčiau; atitinkamai (sausio mėn. SKN -2,9 °C). Lyginant trijų iš eilės einančių metų vasario mėnesius nustatyta, kad 2020 m. vasario mėnesio temperatūra siekė 2,4 °C, o tai yra 4,9 °C šilčiau nei vasario mėn. SKN (-2,5 °C), tuo tarpu 2021 m. vasario mėn. temperatūra siekė -5,7 °C (-3,2 °C šalčiau lyginant su SKN), o 2022 m. vasario mėn. siekė 1,2 °C (3,7 °C šilčiau lyginant su SKN). Kovo mėn. vidutinės oro temperatūros 2020 m., 2021 m. ir 2022 m. buvo 3,3 °C, 1,6 °C ir 1,5 °C, atitinkamai, o tai yra 2,4 °C, 0,7 °C ir 0,6 °C šilčiau, atitinkamai lyginant su kovo mėn. SKN (0,9 °C). 2020 m., 2021 m. ir 2022 m. balandžio mėnesiais nustatyta vidutinė oro temperatūra buvo 6,5 °C, 5,9 °C ir 5,7 °C, atitinkamai ir tai, lyginant su balandžio mėn. SKN (7,2 °C), buvo 0,7 °C, 1,3 °C, 1,5 °C šalčiau. 2020 m. gegužės mėn. vidutinė oro temperatūra buvo 10,2 °C ir tai buvo 2,3 °C vėsiau nei SKN (gegužės mėn. SKN 12,5 °C), tuo tarpu 2021 m. gegužės mėn. vidutinė oro temperatūra siekė 11,1 °C ir tai buvo 1,4 °C vėsiau nei SKN, o 2022 m. gegužės mėn. vidutinė oro temperatūra siekė 10,7 °C ir tai buvo 1,8 °C žemesnė temperatūra lyginant su SKN norma. Birželio mėn. visus trejus metus iš eilės buvo šiltesnis už nustatytą SKN (15,9 °C) ir 2020 m. siekė 18,7 °C (2,8 °C šilčiau), 2021 m. siekė 19,2 °C (3,3 °C šilčiau), o 2022 m. siekė 17,3 °C (1,4 °C šilčiau) temperatūros. Liepos mėnesio temperatūra 2020 metais siekė 17,2 °C ir tai buvo 1,1 °C vėsiau nei SKN norma (18,3 °C), tuo tarpu 2021 metais liepos mėn. temperatūra siekė 22,1 °C (3,8 °C šilčiau), o 2022 metais siekė 17,7 °C (0,6 °C vėsiau). Rugpjūčio mėn. vidutinės oro temperatūros 2020 m., 2021 m. ir 2022 m. buvo 17,2 °C, 16,1 °C ir 20,4 °C, atitinkamai, o tai yra 0,4 °C, 1,5 °C šilčiau ir 2,8 °C vėsiau, atitinkamai lyginant su rugpjūčio mėn. SKN (17,6 °C). Pirmąjį rudenio mėnesį, rugsėjį, nustatyta vidutinė oro temperatūra 2020 metais siekė 14,8 °C ir buvo 2,0 °C šiltesnė už SKN normą (12,8 °C), tuo tarpu 2021 metais nustatyta vidutinė oro temperatūra siekė 11,4 °C ir ji buvo 1,4 °C vėsėsnė lyginti SKN, o 2022 metų rugsėjo mėnesį siekė tik 10,6 °C ir buvo 2,2 °C vėsėsnė lyginti SKN. 2020 m., 2021 m. ir 2022 m. spalio mėn. vidutinė oro temperatūra siekė 10,2 °C, 8,3 °C ir 9,8 °C, atitinkamai ir tai, lyginant su spalio mėn. SKN (7,3 °C) buvo 2,9 °C, 1,0 °C ir 2,5 °C aukštesnė temperatūra. Lapkričio mėnesį nustatyta SKN temperatūra siekė 2,6 °C ir tai buvo 2,8 °C vėsiau lyginant su 2020 m. temperatūra (5,4 °C), 1,4 °C vėsiau lyginant su 2021 m. temperatūra (4,0 °C) ir 0,2 vėsiau lyginant su 2021 m. temperatūra (2,8 °C). Paskutinįjį metų mėnesį, gruodį, 2020 m. nustatyta vidutinė oro temperatūra siekė 0,5 °C, 2021 m. siekė -3,3 °C ir 2022 m. siekė

-2,6 °C ir tai buvo 1,6 °C šilčiau, 2,2 °C vėsiau ir 1,5 °C vėsiau, atitinkamai už nustatytą SKN normą (-1,1°C).

2020 m. sausio mėn. vidutinis kritulių kiekis Lietuvoje buvo apie 59 mm, tuo tarpu 2021 m. sausio mėn. 58 mm, o 2022 m. sausio mėn. 67,3 mm ir tai buvo 6, 5 ir 14,3 mm daugiau lyginant su 1991–2020 m. SKN norma (53 mm). 2020 m., 2021 m. ir 2022 m. vasario mėn. vidutinis kritulių kiekis Lietuvoje siekė 62 mm, 12 mm ir 69,5 mm, atitinkamai ir tai buvo 19 mm daugiau, 31 mm mažiau ir 26,5 mm daugiau palyginus su SKN (43 mm). Kovo mėn. 2020 m. ir 2021 m. nustatytas 39 mm lygus su SKN norma (39 mm) ir 32 mm vidutinis kritulių kiekis, kuris yra mažesnis 7 mm lyginant su SKN norma, atitinkamai, tačiau 2022 m. nustatytas labai mažas vidutinių kritulių kiekis – tik 1,9 mm ir tai yra net 37,1 mm mažesnis kiekis lyginant su SKN. Balandžio mėn. SKN norma siekė 37 mm ir tai 28 mm, 1 mm mažiau ir 6 mm daugiau, atitinkamai nei lyginant su 2020 m., 2021 m. ir 2022 m. vidutiniais kritulių kiekiais, kurie buvo 9 mm, 36 mm ir 43 mm, atitinkamai. 2020 m. gegužės mėn. vidutinis kritulių Lietuvoje buvo 58 mm, tuo tarpu 2021 m. ir 2022 m. siekė 103 mm ir 74 mm atitinkamai, o tai lyginant su SKN (53 mm) buvo 5 mm, 50 mm ir 21 mm daugiau. Prasidėjus vasaros sezonui 2020 m. birželio mėnesį vidutinis kritulių kiekis Lietuvoje siekė 101 mm, o 2021 m. ir 2022 m. – 45 mm ir 98,3 mm, atitinkamai, o tai lyginant su birželio mėn. SKN (68 mm) buvo 33 mm daugiau, 23 mm mažiau ir 30,3 mm daugiau, atitinkamai. Liepos mėnesio nustatyta vidutinė kritulių SKN norma siekė 84 mm, tuo tarpu 2020 m. ji siekė 63 mm, 2021 m. siekė 58 mm, o 2022 m. siekė net 106,7 mm ir tai buvo 21 mm, 26 mm mažiau ir 22,7 mm daugiau lyginant su SKN, atitinkamai. Rugpjūčio mėn. 2020 m. vidutinis kritulių kiekis Lietuvoje siekė 70 mm, 2021 m. rugpjūtis buvo trečias lietingiausias nuo 1961 m. ir jo vidutinis kritulių kiekis Lietuvoje siekė net 141,7 mm, o 2022 metų rugpjūčio mėn. buvo vos 40 mm ir lyginant šių trejų metų kiekius su SKN norma (77 mm) tai buvo 7 mm mažiau, 64,7 mm daugiau ir 37 mm mažiau, atitinkamai. Toliau vertinant rudens sezoną nustatyta, kad rugsėjo mėn. vidutinis kritulių SKN kiekis Lietuvoje siekė 60 mm, o 2020 m., 2021 m. ir 2022 m. buvo 30 mm, 48 mm ir 44 mm, atitinkamai, o tai buvo 30 mm, 12 mm ir 16 mm mažiau. 2020 m. spalio mėn. vidutinis kritulių kiekis Lietuvoje siekė 68 mm ir tai neturėjo skirtumo su nustatyta SKN norma (68 mm), tačiau 2021 m. spalio mėn. jis siekė 48,2 mm, o 2022 m. spalio mėn. siekė 37 mm ir tai buvo 19,8 mm ir 31 mm mažiau nei nustatyta SKN norma. 2020 m. lapkričio mėnesį vidutinis kritulių kiekis Lietuvoje buvo 51 mm, tuo tarpu 2021 m. ir 2022 m. 81,2 mm ir 28,8 mm, atitinkamai ir tai buvo 6 mm mažiau, 24,2 mm daugiau ir 28,2 mm mažiau, atitinkamai, lyginant su lapkričio mėn. SKN norma (57 mm). Paskutinį metų mėnesį, gruodį, nustatyta SKN norma siekė 56 mm, o

2020 m., 2021 m. ir 2022 m. – 34,3 mm, 37,4 mm ir 64,6 mm, atitinkamai, kas buvo 21,7 mm 18,6 mm mažiau ir 8,6 mm daugiau už nustatytą SKN normą.

3.2. Mikroorganizmų izoliavimas, molekulinis identifikavimas ir filogenetinė analizė

Tiriamąjį darbo metu kiekvienais trimis iš eilės einančiais sėjomainos metais (2020–2022 m.) iš kiekvieno tiriamojo objekto ir jame kultivuojamos augalų kultūros rizosferos dirvožemio mėginių buvo išskirti mikroorganizmai, pasižymintys skirtinga morfologija ir augalų augimą skatinančiomis savybėmis. 2020 metais visuose trijuose žemės ūkio paskirties laukuose buvo auginama *Z. mays* kultūra. Kompleksiniame rizosferos dirvožemio mėginyje iš JAK dirbamos žemės ploto buvo išskirti 92 skirtinga morfologija pasižymintys mikroorganizmai.

3.3 lentelė. Bendras izoliuotų mikroorganizmų skaičius tyrimo metu (2020–2022 metai).

Dirvožemio mėginių surinkimo laikas	2020 m. (<i>Z. mays</i>)			2021 m. (<i>P. vulgaris</i>)			2022 m. (<i>T. aestivum</i>)		
Lokacija	JAK	BEI	DEG	JAK	BEI	DEG	JAK	BEI	DEG
Bendras izoliuotų mikroorganizmų skaičius	92	120	113	101	112	108	104	105	100
	Viso: 325			Viso: 321			Viso: 309		

Lygiagrečiai atliekant tuos pačius bandymus su BEI ir DEG žemės ūkio laukuose augusių *Z. mays* kompleksinių rizosferos dirvožemio mėginių buvo išskirti atitinkamai 120 ir 113 morfologiškai skirtingų mikroorganizmų. Viso 2020 m. iš visų trijų žemės ūkio paskirties plotų ir juose auginamų paprastųjų kukurūzų rizosferos dirvožemių buvo izoliuoti 325 morfologiškai skirtingi mikroorganizmai. Sekančiais 2021 tyrimo metais, JAK, BEI ir DEG žemės ūkio paskirties laukuose buvo kultivuojama *P. vulgaris* kultūra. Iš šių kultivuojamų augalų kultūros kompleksinio rizosferos dirvožemio mėginio, kuris buvo surinktas iš JAK lauko buvo izoliuotas 101 morfologiškai skirtingas mikroorganizmas, o iš BEI ir DEG kompleksinių rizosferos dirvožemio mėginių – 112 ir 108 morfologiškai skirtingi mikroorganizmai, atitinkamai. Bendrai, 2021 metais, iš visuose žemės ūkio paskirties plotuose augintos *P. vulgaris* kultūros rizosferos izoliuotas 321 morfologiškai skirtingas mikroorganizmas. Paskutiniaisiais 2022 tyrimo metais ir JAK, BEI ir DEG žemės ūkio paskirties žemės ir juose kultivuojamos *T. aestivum* augalų

kultūros rizosferos dirvožemio mėginių buvo išskirti 104, 105 ir 100 morfologiškai skirtingų mikroorganizmų, atitinkamai, o bendras morfologiškai izoliuotų mikroorganizmų skaičius siekė 309 (**3.3 lentelė**).

Kiekvienais tyrimo metais buvo atrinkta po devynis skirtingus izoliuotus mikroorganizmus, t.y. po tris izoliatus iš kiekvienos žemės ūkio paskirties žemės (trys žemės ūkio paskirties žemės $\times$ trys izoliuoti mikroorganizmai = devyni skirtingi izoliuoti mikroorganizmai). Mikroorganizmų atrankos metu svarbiausias aspektas buvo atsitiktinai izoliuoti tris skirtingas mikroorganizmų gentis iš tos pačios žemės ūkio paskirties žemės.

Pirmaisiais tyrimo metais, iš JAK, BEI ir DEG Z. *mays* rizosferos dirvožemio mėginių išskirtų izoliatų buvo atrinkta po tris skirtingas mikroorganizmų gentis, o 16S rDNR sekos analizė priskyrė juos *Bacillus* spp. (arba *Priestia* spp.), *Pseudomonas* spp. ir *Rhodococcus* spp. gentims. Kiekvienu tyrimo atveju, kiekvienam iš žemės ūkio paskirties naudmenų buvo priskirta po vieną *Bacillus* sp. (arba *Priestia* sp.), *Pseudomonas* sp. ir *Rhodococcus* sp. gentį. Palyginamoji analizė parodė, kad pirmoje grupėje (IJAK) izoliatai IJAK92, IJAK41 ir IJAK17 turėjo sekos padengimą su *Bacillus altitudinis* 41KF2b (100 %), *Pseudomonas thivervalensis* DSM 13194 (100 %) ir *Rhodococcus qingshengii* JCM 15477 (100 %) rūšimis, atitinkamai. Antroje tyrimų grupėje (IIBEI) izoliatai IIBEI11, IIBEI19 ir IIBEI38 gautuose analizės rezultatuose buvo prilyginti su *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 (100 %), *Pseudomonas laurylsulfatiphila* AP3_16 (100 %) ir *Rhodococcus erythropolis* NBRC 15567 (100 %), atitinkamai. Paskutinėje tyrimo grupėje (IIIDEG) 16S rRNR geno palyginamoji analizė parodė, kad izoliuoti mikroorganizmai IIIDEG4, IIIDEG59 ir IIIDEG40 buvo artimiausi *Priestia aryabhatai* B8W22 (100 %), *Pseudomonas laurylsulfatorans* AP3_22 (100 %) ir *Rhodococcus erythropolis* NBRC 15567 (100 %), atitinkamai (**3.4 lentelė**).

Sekančiais tyrimo metais, iš JAK, BEI ir DEG žemės ūkio naudmenų, kuriuose buvo kultivuojama *P. vulgaris* kultūra, surinktų rizosferos dirvožemio mėginių buvo izoliuotos ir atrinktos trys skirtingos mikroorganizmų gentys: *Pararhizobium* spp., *Paenibacillus* spp. ir *Bacillus* spp. (arba *Priestia* spp.). Pirmoje tyrimų grupėje (IJAK) atlikus 16S rDNR palyginamąją analizę nustatyta, kad izoliatai IJAK2, IJAK19 ir IJAK94 yra filogenetiškai artimiausi atitinkamai *Pararhizobium giardinii* H152 (100 %), *Paenibacillus xylanexedens* B22a (100 %) ir *Bacillus mycoides* DSM 2048 (100 %) bakterijų kultūrų rūšims. Antroje grupėje (IIBEI) izoliuoti mikroorganizmai IIBEI80, IIBEI61 ir IIBEI14 buvo prilyginti atitinkamai *Pararhizobium giardinii* H152 (100 %), *Paenibacillus amylolyticus* NBRC 15957 (100 %), ir *Bacillus pumilus* ATCC 7061 (100 %) rūšims. Trečioje

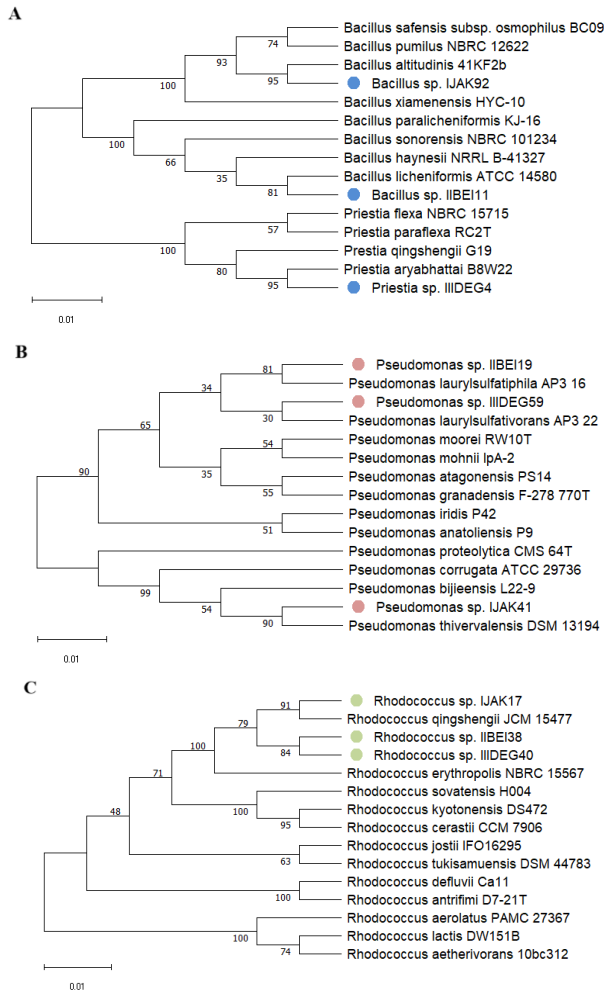
tyrimo grupėje (IIIDEG) po atrankos pasirinkti izoliuoti mikroorganizmai IIIDEG9, IIIDEG36 ir IIIDEG93 identifiukuoti kaip atitinkamai *Pararhizobium giardinii* H152 (100 %), *Paenibacillus farraposensis* UY79 (100 %) ir *Priestia megaterium* NBRC 15308 (100 %).

Paskutiniaais tyrimo metais, kuomet JAK, BEI ir DEG žemės ūkio paskirties žemėse buvo kultivuojama *T. aestivum* kultūra, nustatyta, kad izoliuoti ir atrinkti augalų rizosferos mikroorganizmai priklausė trimis skirtingoms gentims: *Bacillus* spp. (arba *Priestia* spp.), *Pseudomonas* spp., *Streptomyces* spp. Pirmoje tyrimų grupėje (IJAK) 16S rDNR sekos analizė parodė, kad izoliatai IJAK27, IJAK44 ir IJAK91 filogenetiškai buvo artimiausi su atitinkamai *Bacillus toyonensis* CNCM I-1012 (100 %), *Pseudomonas bijieensis* L22-9 (100 %) ir *Streptomyces gardneri* NBRC 3385 (100 %) rūšimis. Antroje tyrimų grupėje (IIBEI) atlikta analizė parodė, jog izoliuoti mikroorganizmai IBEI32, IIBEI40 ir IIBEI22 buvo filogenetiškai panašūs atitinkamai į *Priestia aryabhattai* B8W22 (100 %), *Pseudomonas helmanticensis* OHA11 (100 %) ir *Streptomyces anulatus* NBRC 13369 (100 %). Trečioje tyrimo grupėje (IIIDEG) atlikus pirminius sekoskaitos duomenis, surinkus DNR sekas nustatyta, jog izoliuoti mikroorganizmai IIIDEG45, IIIDEG41 ir IIIDEG72 turėjo sekos padengimą su *Bacillus tequilensis* NIO-Zn4 (100 %), *Pseudomonas granadensis* F-278,770T (100 %) ir *Streptomyces badius* NBRC 12745 (100 %), atitinkamai. Visa bendra molekulinės identifikacijos informacija pagal 16S rRNR seką pateikta **3.4 lentelėje**.

3.4 lentelė. 16S rRNR geno palyginamoji analizė su tipiniais bakterijų kultūrų 16S genais.

Sekos ID	Rūšis	Kamienas	Sekai priskirtas numeris	Sekos panašumas (%)	Neatitikę nukleotidai/viso nukleotidų	Sekos padengimas (%)
IJAK92	<i>Bacillus altitudinis</i>	41KF2b	ASJC01000029	99,86	2/1429	100
IJAK41	<i>Pseudomonas thivervalensis</i>	DSM 13194	LHVE01000021	99,50	7/1420	100
IJAK17	<i>Rhodococcus qingshengii</i>	JCM 15477	LRRJ01000016	99,85	2/1390	100
IIBEI11	<i>Bacillus licheniformis</i>	ATCC 14580	AE017333	99,43	8/1427	100
IIBEI19	<i>Pseudomonas laurylsulfatiphila</i>	AP3_16	KY462012	99,71	4/1390	100
IIBEI38	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	NBRC 15567	BCRM01000055	99,26	10/1367	100
IIIDE4	<i>Priestia aryabhatai</i>	B8W22	KY882273	100,00	0/1150	100
IIIDE59	<i>Pseudomonas laurylsulfativorans</i>	AP3_22	MF554631	99,43	8/1415	100
IIIDE40	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	NBRC 15567	BCRM01000055	99,20	11/1390	100
IJAK2	<i>Pararhizobium giardinii</i>	H152	ARBG01000149	99,92	1/1350	100
IJAK19	<i>Paenibacillus xylanexedens</i>	B22a	EU558281	98,72	18/1410	100
IJAK94	<i>Bacillus mycoides</i>	DSM 2048	ACMU01000002	99,72	4/1436	100
IIBEI80	<i>Pararhizobium giardinii</i>	H152	ARBG01000149	99,47	7/1340	100
IIBEI61	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	NBRC 15957	BIMJ01000009	99,65	5/1429	100
IIBEI14	<i>Bacillus pumilus</i>	ATCC 7061	ABRX01000007	99,92	1/1406	100
IIIDE9	<i>Pararhizobium giardinii</i>	H152	ARBG01000149	99,40	8/1340	100
IIIDE36	<i>Paenibacillus farraposensis</i>	UY79	MT973969	99,25	10/1348	100
IIIDE93	<i>Priestia megaterium</i>	NBRC 15308	JJMH01000057	100,00	0/1390	100
IJAK27	<i>Bacillus toyonensis</i>	CNCM I-1012	AJ310101	99,71	4/1390	100
IJAK44	<i>Pseudomonas bijieensis</i>	L22-9	MT835388	99,78	3/1386	100
IJAK91	<i>Streptomyces gardneri</i>	NBRC 3385	NR_041204	100,00	0/1360	100
IIBEI32	<i>Priestia aryabhatai</i>	B8W22	EF114313	99,78	3/1415	100
IIBEI40	<i>Pseudomonas helmanticensis</i>	OHA11	HG940537	99,12	12/1376	100
IIBEI22	<i>Streptomyces anulatus</i>	NBRC 13369	NR_112527	99,57	6/1421	100
IIIDE45	<i>Bacillus tequilensis</i>	NIO-Zn4	KJ847721	99,85	2/1410	100
IIIDE41	<i>Pseudomonas granadensis</i>	F-278,770T	HG764746	99,35	9/1380	100
IIIDE72	<i>Streptomyces badius</i>	NBRC 12745	AB184114	99,50	7/1421	100

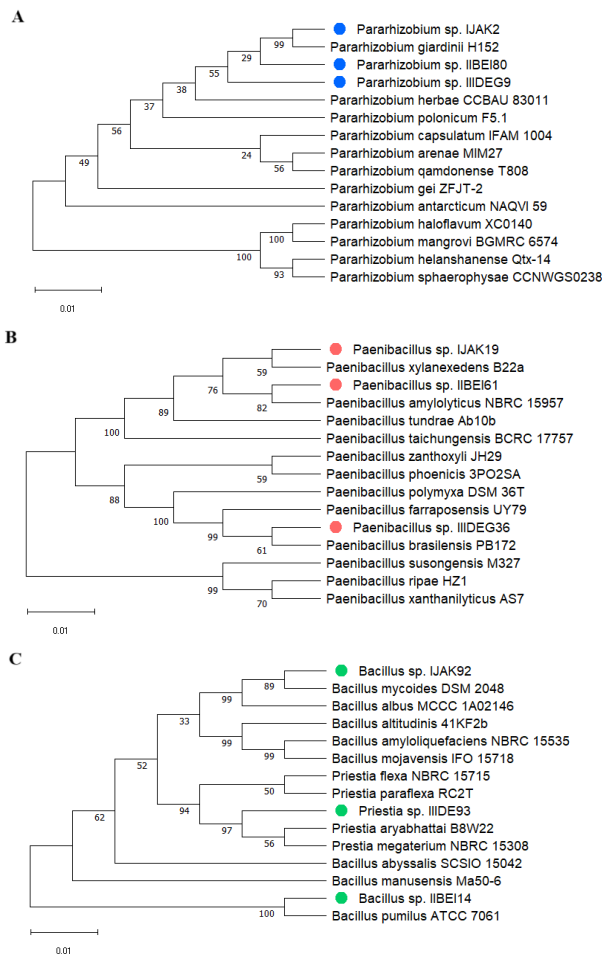
Pirmą tyrimų grupę sudarė *Bacillus* (arba *Priestia*) spp., *Pseudomonas* spp. ir *Rhodococcus* spp. genčių izoliatai. Filogenetinės analizės metu izoliatai IJAK92, IIBEI11 ir IIIDEG4 buvo palyginti su kitomis filogenetiškai artimiausiomis *Bacillus* ir *Priestia* genčių rūšimis bei nustatyta, kad kamienai yra artimiausi *Bacillus altitudinis* 41KF2b, *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 ir *Priestia aryabhattai* B8W22 rūšims, atitinkamai (**3.2A pav.**).



3.2 pav. Pirmosios tyrimų grupės (2020 m.) trijų skirtingų genčių: *Bacillus* (ir *Priestia*) spp. genties izoliatų *Bacillus* sp. IJAK92, *Bacillus* sp. IIBEI11 ir *Priestia* sp. IIIDEG4 (**A**) (dendrogramose pažymėta šviesiai mėlyna spalva); *Pseudomonas* spp. genties izoliatų *Pseudomonas* sp. IJAK41, *Pseudomonas* sp. IIBEI19 ir *Pseudomonas* sp. IIIDEG59 (**B**) (dendrogramose pažymėta rausva spalva); ir *Rhodococcus* spp. genties izoliatų *Rhodococcus* sp. IJAK17, *Rhodococcus* sp. IIBEI38 ir *Rhodococcus* sp. IIIDEG40 (**C**) (dendrogramose pažymėta šviesiai žalia spalva) filogenetinės padėtys. Evoliuciniai ryšiai sudaryti naudojant Neighbor-Joining metodą. Brūkšnys žymi 0,01 nukleotido pasikeitimų vienoje padėtyje. Evoliucinė analizė atlikta naudojant MEGA11 programinę įrangą.

Siekiant nustatyti *Pseudomonas* spp. genties izoliatų IJAK41, IIBEI19 ir IIIDEG59 kamienų filogenetinę padėtį tarp kitų *Pseudomonas* genties rūšių, sudarytas filogenetinis medis naudojant kitas filogenetiškai artimiausias *Pseudomonas* genties rūšis ir nustatyta, jog izoliatai yra artimiausi *Pseudomonas thivervalensis* DSM 13194, *Pseudomonas laurylsulfatiphila* AP3_16, *Pseudomonas laurylsulfativorans* AP3_22 rūšims, atitinkamai (**3.2B pav.**). Filogenetinės analizės rezultatai parodė, kad izoliatai IJAK17, IIBEI38 ir IIIDEG40 priklauso *Rhodococcus* genčiai ir lyginant juos su *Rhodococcus* genties rūšimis izoliatas IJAK17 nurodė didžiausią panašumą rūšiai *Rhodococcus qingshengii* JCM 15477, o izoliatai IIBEI38 ir IIIDEG40 turėjo didžiausią panašumą su *Rhodococcus erythropolis* NBRC 15567 rūšimi (**3.2C pav.**).

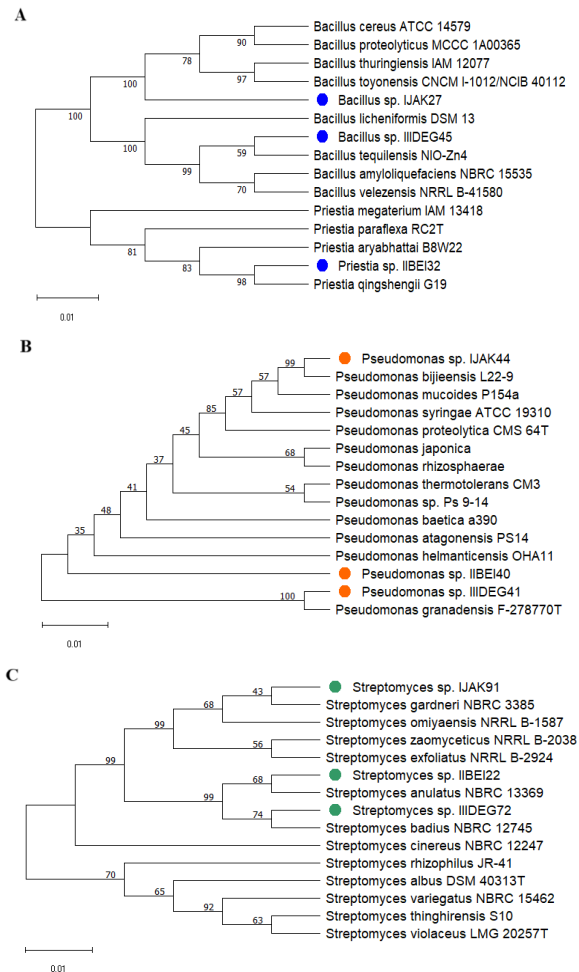
Antroje tyrimo grupėje filogenetinio medžio rezultatų analizė patvirtino, kad izoliatai IJAK2, IIBEI80 ir IIIDEG9 priklausė *Pararhizobium* genties bakterijoms ir visi trys izoliatai buvo artimiausi *Pararhizobium giardinii* H152 rūšiai (**3.3A pav.**). Taipogi patvirtinta, kad izoliatai IJAK19, IIBEI61 ir IIIDEG36 priklausė *Paenibacillus* genčiai, o analizuojant detaliau izoliatas IJAK19 buvo artimiausias *Paenibacillus xylanexedens* B22a rūšiai, izoliatas IIBEI61 – *Paenibacillus amylolyticus* NBRC 15957 rūšiai, o izoliatas IIIDEG36 – *Paenibacillus farraposensis* UY79 rūšiai (**3.3B pav.**). Likusieji antrosios tyrimų grupės izoliatai IJAK94, IIBEI14 ir IIIDEG93 po atliktos filogenetinės analizės patvirtino, kad izoliuoti kamienai priklausė *Bacillus* arba *Priestia* genčių bakterijoms. Izoliatas IJAK94 buvo artimiausias *Bacillus mycoides* DSM 2048 rūšiai, izoliatas IIBEI14 buvo artimiausias *Bacillus pumilus* ATCC 7061 rūšiai, o izoliatas IIIDEG93 *Priestia megaterium* NBRC 15308 rūšiai (**3.3C pav.**).



3.3 pav. Antrosios tyrimų grupės trijų skirtingų genčių: *Pararhizobium* spp. genties izoliatų *Pararhizobium* sp. IJA2, *Pararhizobium* sp. IIBE180 ir *Pararhizobium* sp. IIIDE9 (A) (dendrogramose pažymėta mėlyna spalva); *Paenibacillus* spp. genties izoliatų *Paenibacillus* sp. IJA19, *Paenibacillus* sp. IIBE161 ir *Paenibacillus* sp. IIIDE36 (B) (dendrogramose pažymėta raudona spalva); ir *Bacillus* (*Priestia*) spp. genties izoliatų *Bacillus* sp. IJA92, *Bacillus* sp. IIBE114 ir *Priestia* sp. IIIDE93 (C) (dendrogramose pažymėta žalia spalva) filogenetinės padėties. Evoliuciniai ryšiai sudaryti naudojant Neighbor-Joining metodą. Brūkšnys žymi 0,01 nukleotido pasikeitimų vienoje padėtyje. Evoliucinė analizė atlikta naudojant MEGA11 programinę įrangą.

Paskutinėje, trečiojo tyrimo grupėje, siekiant nustatyti *Bacillus toyonensis* IJA27, *Priestia aryabhatai* IIBE132 ir *Bacillus tequilensis* IIIDE45 kamienų filogenetinę padėtį tarp kitų *Bacillus* ir *Priestia* genties rūšių, nubraižytas filogenetinis medis naudojant tipinius *Bacillus* ir *Priestia* genties kamienus. Sudaryto filogenetinio medžio rezultatų analizė patvirtino, kad IJA27, IIBE132 ir IIIDE45 kamienai priklausė *Bacillus* (ar *Priestia*) genčiai ir rodė didžiausią panašumą tipinėms *Bacillus toyonensis* CNCM I-

1012/NCIB 40112, *Priestia aryabhatai* B8W22 ir *Bacillus tequilensis* NIO-Zn4 rūšims, atitinkamai (**3.4A pav.**).



3.4 pav. Trečiosios tyrimų grupės trijų skirtingų genčių: *Bacillus* (*Prestia*) spp. genties izoliatų *Bacillus* sp. IJAK27, *Priestia* sp. IIBEI32 ir *Bacillus* sp. IIIDEG45 (**A**) (dendrogramose pažymėta tamsiai mėlyna spalva); *Pseudomonas* spp. genties izoliatų *Pseudomonas* sp. IJAK44, *Pseudomonas* sp. IIBEI40 ir *Pseudomonas* sp. IIIDEG41 (**B**) (dendrogramose pažymėta oranžine spalva); ir *Streptomyces* spp. genties izoliatų *Streptomyces* sp. IJAK91, *Streptomyces* sp. IIBEI22 ir *Streptomyces* sp. IIIDEG72 (**C**) (dendrogramose pažymėta tamsiai žalia spalva) filogenetinės padėtyys. Evoliuciniai ryšiai sudaryti naudojant Neighbor-Joining metodą. Brūkšnyss žymi 0,01 nukleotido pasikeitimų vienoje padėtyje. Evoliucinė analizė atlikta naudojant MEGA11 programinę įrangą.

Siekiant nustatyti *Pseudomonas bijieensis* IJAK44, *Pseudomonas helmanticensis* IIBEI40 ir *Pseudomonas granadensis* IIIDEG41 izoliatų evoliucinius ryšius tarp kitų tipinių *Pseudomonas* genties rūšių sudarius

filogenetinę medį nustatyta, kad izoliatai IJAK44, IIBEI40 ir IIIDEG41 priklausė *Pseudomonas* genčiai ir parodė didžiausią panašumą tipinėms *Pseudomonas bijieensis* L22-9, *Pseudomonas helmanticensis* OHA11 ir *Pseudomonas granadensis* F-278, 770T rūšims, atitinkamai (**3.4B pav.**). Atlikus filogenetinę analizę tarp izoliuotų mikroorganizmų *Streptomyces gardneri* IJAK91, *Streptomyces anulatus* IIBEI22 ir *Streptomyces badius* IIIDEG72 nustatyta, kad šie išskirti mikroorganizmai priklauso *Streptomyces* genčiai ir lyginant juos su tipinėmis *Streptomyces* genties rūšimis kamienai IJAK91, IIBEI22 ir IIIDEG72 rodė didžiausią panašumą tipinėms *Streptomyces gardneri* NBRC 3385, *Streptomyces anulatus* NBRC 13369 ir *Streptomyces badius* NBRC 12745 rūšims, atitinkamai (**3.4C pav.**).

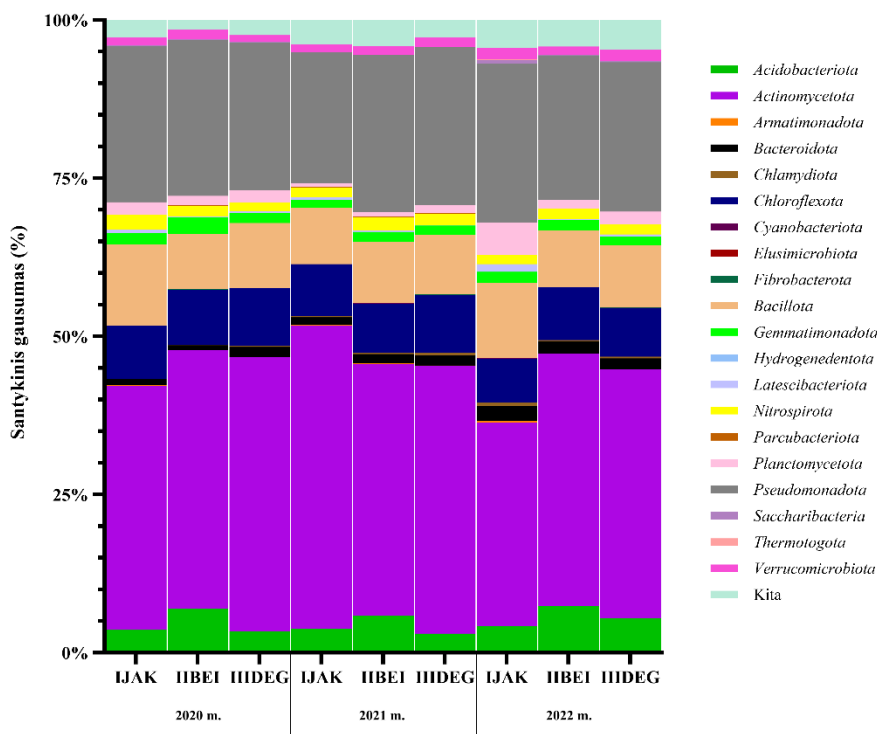
3.3. Bakterijų mikrobiotos sudėties analizė rizosferiniuose dirvožemio mėginiuose

Pagal biologinę gyvųjų organizmų klasifikaciją, bakterijose tipų lygmeniu iš viso nustatyta po 20 skirtingų taksonų kiekviename iš 9 analizuotų rizosferos dirvožemio mėginių. *Actinomycetota*, *Pseudomonadota*, *Bacillota*, *Chloroflexota* ir *Acidobacteriota* pagal santykinį gausumą buvo penki gausiausi bakterijų tipai visuose tirtuose rizosferos dirvožemio mėginiuose. Jų santykinis gausumas rizosferos dirvožemio mėginiuose svyravo nuo 32,2 % iki 47,9 %, nuo 20,7 % iki 25,1 %, nuo 8,7 % iki 12,8 %, nuo 7,4 % iki 9,1 % ir nuo 3,0 % iki 8,4 %, atitinkamai.

Pirmaisiais tyrimo metais (2020 m.) nustatyta, jog *Actinomycetota* buvo labiausiai dominuojantis bakterijų tipas IJAK (38,6 %), IIBEI (40,8 %) ir IIIDEG (43,3 %) tirtuose *Z. mays* rizosferos dirvožemio mėginiuose. *Pseudomonadota* buvo sekantis pagal santykinį gausumą labiausiai vyravęs bakterijų tipas IJAK (24,7 %), IIBEI (24,6 %) ir IIIDEG (23,3 %) rizosferos dirvožemiuose. Nors *Bacillota* pagal santykinį gausumą buvo trečioje vietoje, šis tipas taip pat dominavo IJAK (12,8 %), IIBEI (8,7 %) ir IIIDEG (10,3 %) dirvožemiuose. *Chloroflexota* bakterijų tipo santykinis gausumas siekė 8,5 %, 8,6 % ir 9,1 % IJAK, IIBEI ir IIIDEG rizosferiniuose dirvožemio mėginiuose, atitinkamai. Paskutinytis iš penkių, labiausiai dominavusių bakterijų tipų buvo *Acidobacteriota* ir analizuotuose mėginiuose sudarė IJAK – 3,6 %, IIBEI – 7,0 % ir IIIDEG – 3,4 % santykinį gausumą. Nenustatytos ar nei vienam bakterijų tipui nepriskirtos bakterijos sudarė 2,8 %, 1,5 % ir 2,4 % santykinio gausumo IJAK, IIBEI ir IIIDEG rizosferos dirvožemio mėginiuose, atitinkamai. Likusių bakterijų tipų sudėtis IJAK, IIBEI ir IIIDEG rizosferos dirvožemio mėginiuose pasiskirstė atitinkamai 9,0 %, 8,8 % ir 8,2 % nuo likusio bendro santykinio gausumo (100 %).

Antraisiais tyrimo metais (2021 m.), *P. vulgaris* rizosferos dirvožemio mėginiuose labiausiai dominavęs bakterijų tipas taip pat buvo *Actinomycetota* IJAK (47,9 %), IIBEI (39,8 %) ir IIIDEG (42,3 %). Antroje vietoje, pagal santykinę gausumą vyravo *Pseudomonadota* bakterijų tipas IJAK (20,7 %), IIBEI (24,9 %) ir IIIDEG (25,0 %) dirvožemio mėginiuose. *Bacillota* IJAK (8,9 %), IIBEI (9,6 %) ir IIIDEG (9,4 %) mėginiuose pagal santykinę gausumą buvo trečioje vietoje, o *Chloroflexota* bakterijų tipas buvo panašaus santykio gausumo su *Bacillota* tipu: IJAK (8,2%), IIBEI (7,8 %) ir IIIDEG (9,1 %). Penktasis, labiausiai vyravęs tipas IJAK (3,8 %), IIBEI (5,8 %) ir IIIDEG (3,0 %) rizosferos dirvožemio mėginiuose buvo *Acidobacteriota*. Nežinomos ir nei vienam tipui nepriskirtos bakterijos sudarė 3,9 %, 4,1 % ir 2,7 % nuo bendro santykinio gausumo IJAK, IIBEI ir IIIDEG rizosferos dirvožemio mėginiuose, atitinkamai. Likusių bakterijų tipų sudėtis IJAK, IIBEI ir IIIDEG rizosferos dirvožemio mėginiuose pasiskirstė atitinkamai 6,6 %, 8,0 % ir 8,5 % nuo likusio bendro santykinio gausumo (100 %).

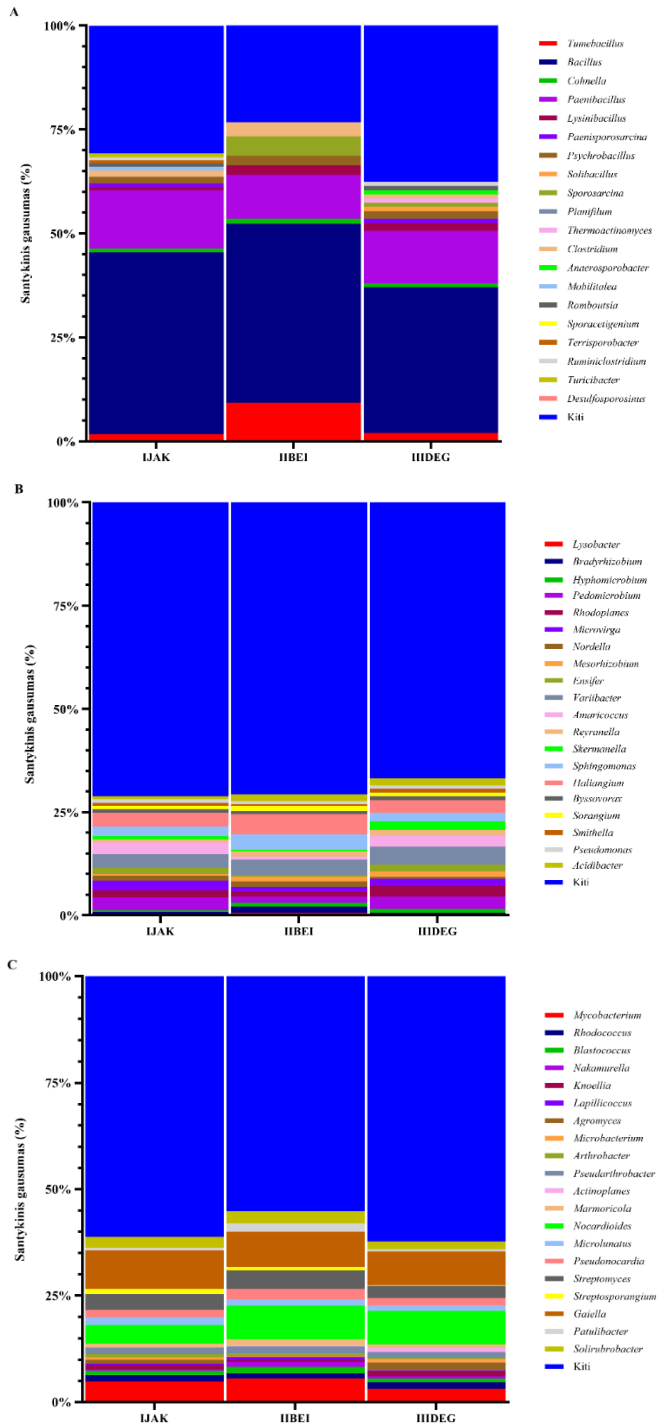
Trečiaisiais tyrimo metais (2022 m.), remiantis gyvųjų organizmų taksonomijos klasifikacija, *Actinomycetota* buvo labiausiai dominuojantis IJAK (32,2 %), IIBEI (39,9 %) ir IIIDEG (39,4 %) bakterijų tipas *T. aestivum* rizosferos dirvožemio mėginiuose. Antrasis, labiausiai vyravęs, bakterijų tipas buvo *Pseudomonadota* IJAK (25,1 %), IIBEI (22,8 %) ir IIIDEG (23,6 %). *Bacillota* pagal santykinę gausumą buvo trečioje vietoje IJAK (11,9 %), IIBEI (9,0 %) ir IIIDEG (9,8 %) rizosferos dirvožemio mėginiuose. Bakterijų *Chloroflexota* tipas buvo ketvirtoje vietoje pagal labiausiai dominuojančius tipus IJAK (6,9 %), IIBEI (8,4 %) ir IIIDEG (7,6 %) tirtuose mėginiuose. Tuo tarpu, *Acidobacteriota* tipas sudarė mažiausią santykinę gausumą iš penkių labiausiai dominuojančių tipų: IJAK (4,2 %), IIBEI (7,4 %) ir IIIDEG (5,4 %). Nežinomos ir nei vienam tipui nepriskirtos bakterijos sudarė 4,4 %, 4,2 % ir 4,7 % santykinio gausumo IJAK, IIBEI ir IIIDEG rizosferos dirvožemio mėginiuose, atitinkamai. Likusių bakterijų tipų sudėtis IJAK, IIBEI ir IIIDEG rizosferos dirvožemio mėginiuose sudarė atitinkamai 15,3 %, 8,3 % ir 9,5 % nuo likusio bendro santykinio gausumo (100 %) (**3.5 pav.**).



3.5 pav. Bakterijų tipų santykinis gausumas tirtuose rizosferos dirvožemio mėginiuose (2020–2022 m.). Kiekvienas stulpelis žymi vieną rizosferos dirvožemio ėminio pavyzdį, o skirtingos spalvos stulpeliuose skirtingos bakterijų tipus.

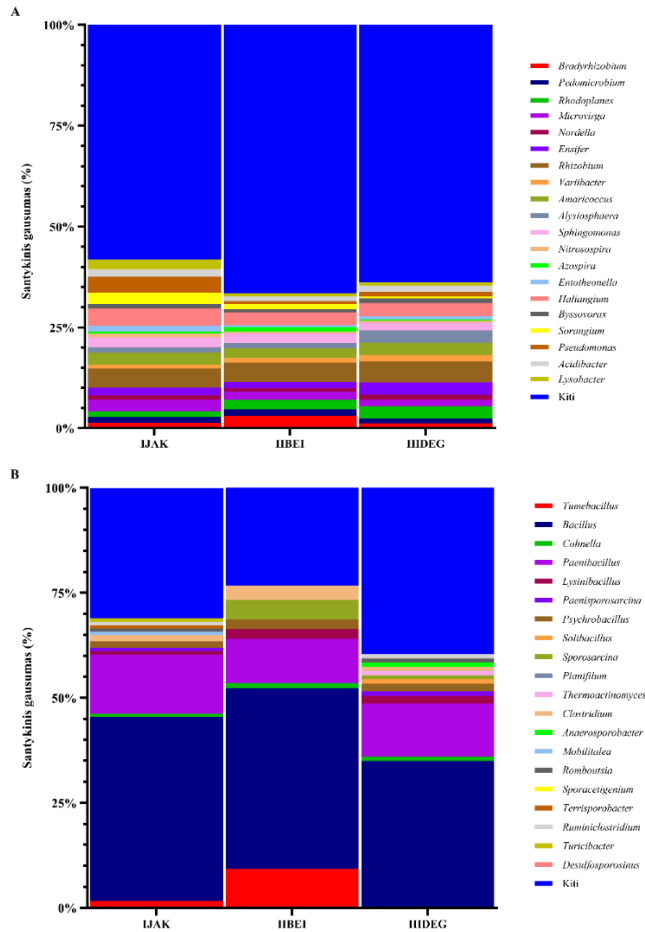
Pagal gautus tyrimo rezultatus tolimesnei ir detalesnei mikrobiotos analizei atlikti pasirinkti tie bakterijų tipai, kuriems priklausė šiame moksliniame tyrime izoliuoti mikroorganizmai. Nustatyta, kad visi izoliuoti mikroorganizmai priklausė *Actinomycetota*, *Pseudomonadota* ir *Bacillota* bakterijų tipams. Pasirinkta po 20 labiausiai dominuojančių genčių kiekviename bakterijų tipe. Mikroorganizmai *Bacillus* sp. IAJK92, *Bacillus* sp. IIBEI11 ir *Prestia* sp. IIIDEG priskirti *Bacillus* (*Prestia*) genčiai ir atlikus mikrobiotos sudėties analizę iki genties lygmens nustatyta, kad *Bacillus* yra labiausiai dominuojanti *Bacillota* bakterijų tipo gentis IJAK (43,8 %), IIBEI (43,0 %) ir IIIDEG (35,0 %) *Z. mays* rizosferos dirvožemio mėginiuose, kurie buvo surinkti 2020 m. *Bacillota* bakterijų tipe taip pat ryškiai dominavo *Paenibacillus* gentis, kuri IJAK, IIBEI ir IIIDEG *Z. mays* rizosferos dirvožemio mėginiuose sudarė 14,1 %, 10,5 % ir 12,6 %, atitinkamai. *Tumebacillus* gentis buvo trečioje vietoje pagal labiausiai dominavusių *Bacillota* tipo genčių skaičių IJAK (1,7 %), IIBEI (9,3 %) ir IIIDEG (2,0 %) ėminiuose. Likusių 17 bakterijų genčių santykinis gausumas kiekviename iš

IJAK, IIBEI ir IIIDEG rizosferos dirvožemio mėginių sudarė atitinkamai 9,6 %, 14,0 % ir 12,8 %. Nei vienai genčiai nepriskirti ar mažiau nei 0,1 % santykinio gausumo sudarę mikroorganizmai IJAK, IIBEI ir IIIDEG mėginiuose sudarė po 30,8 %, 23,2 % ir 37,6 %, atitinkamai nuo likusių bendrų santykinų gausumų (100 %) (**3.6A pav.**). Mikroorganizmai *Pseudomonas* sp. IJAK41, *Pseudomonas* sp. IIBEI19 ir *Pseudomonas* sp. IIIDEG59 priklauso *Pseudomonas* genčiai, kuri priklauso *Pseudomonadota* bakterijų tipui. Mikrobiotos analizės rezultatai parodė, jog *Pseudomonas* gentis iš 20 labiausiai dominavusių genčių *Pseudomonadota* bakterijų tipe sudarė sąlyginai labai mažą santykinį gausumą IJAK (0,8 %), IIBEI (0,8 %) ir IIIDEG (0,9 %) *Z. mays* rizosferos dirvožemio mėginiuose. Nustatyta, kad pagal santykinį gausumą IJAK, IIBEI ir IIIDEG *Pseudomonadota* bakterijų tipe labiausiai dominavo trys gentys: *Haliangium*, *Variibacter* ir *Pedomicrobium*. *Haliangium* gentis IJAK, IIBEI ir IIIDEG dirvožemiuose sudarė 3,3 %, 4,9 % ir 3,0 % santykinio gausumo, atitinkamai. *Variibacter* gentis sudarė 3,2 %, 3,7 % ir 4,3 % santykio gausumo, atitinkamai, o *Pedomicrobium* gentis sudarė 3,2 %, 1,6 %, 3,0 % santykinio gausumo, atitinkamai. Likusių 17 labiausiai dominavusių *Pseudomonadota* genčių bendras santykinis gausumas kiekviename iš IJAK, IIBEI ir IIIDEG *Z. mays* rizosferos dirvožemio mėginių sudarė 19,2 %, 19,1 % ir 22,9 %, atitinkamai. Nei vienai genčiai nepriskirti ar mažiau nei 0,1 % santykinio gausumo sudarę mikroorganizmai IJAK, IIBEI ir IIIDEG mėginiuose sudarė po 71,1 %, 70,7 % ir 66,8 %, atitinkamai nuo likusių bendrų santykinų gausumų (100 %) (**3.6B pav.**). Nors pagal gautus analizės rezultatus nustatyta, jog *Actinomycetota* yra labiausiai dominuojantis bakterijų tipas visuose 2020 m. *Z. Mays* rizosferos dirvožemio mėginiuose, tačiau genties lygmeniu *Rhodococcus* gentis buvo santykinai mažo gausumo IJAK (1,5 %), IIBEI (1,2 %) ir IIIDEG (1,5 %). Nustatyta, kad *Gaiella* gentis sudarė didžiausią santykinį gausumą tirtuose dirvožemiuose ir sudarė 9,1 %, 8,3 % ir 7,9 %, atitinkamai. Taip pat pagal dominavimą pirmavo *Nocardioides* gentis, kurios santykinis gausumas IJAK, IIBEI ir IIIDEG rizosferos dirvožemio mėginiuose siekė 4,4 %, 7,8 % ir 7,9 %, atitinkamai. *Mycobacterium* buvo dar viena gentis, kuri labiausiai dominavo *Actinomycetota* tipe IJAK (4,9 %), IIBEI (5,6 %) ir IIIDEG (3,2 %) rizosferos dirvožemiuose. Likusių 17 labiausiai dominavusių *Actinomycetota* tipo genčių bendras santykinis gausumas kiekviename iš IJAK, IIBEI ir IIIDEG rizosferos dirvožemio mėginių sudarė 20,4 %, 23,2 % ir 18,7 %, atitinkamai. Nei vienai genčiai nepriskirti ar mažiau nei 0,1 % santykinio gausumo sudarę mikroorganizmai IJAK, IIBEI ir IIIDEG mėginiuose sudarė po 61,2 %, 55,1 % ir 62,3 %, atitinkamai nuo likusių bendrų santykinų gausumų (100 %) (**3.6C pav.**).



3.6 pav. *Bacillota* (A), *Pseudomonadota* (B) ir *Actinomycetota* (C) tipų ir šiems tipams priklausančių 20 labiausiai dominuojančių genčių santykinis gausumas *Z. mays* rizosferos dirvožemio mėginiuose IJAK, IIBEI ir IIIDEG 2020 metais.

Nustatyta, kad 2021 metų tyrimo grupėje iš IJAK, IIBEI ir IIIDEG žemės ūkio paskirties žemės ir juose kultivuotos augalų kultūros *P. vulgaris* rizoferos dirvožemio išskirti izoliatai priklausė *Pseudomonadota* ir *Bacillota* bakterijų tipams. *Pseudomonadota* tipui priklausė *Pararhizobium* sp. IJAK2, *Pararhizobium* sp. IIBEI80 ir *Pararhizobium* sp. IIIDEG9 mikroorganizmai, o visi likę, *Paenibacillus* sp. IJAK19, *Bacillus* sp. IJAK94, *Paenibacillus* sp. IIBEI61, *Bacillus* sp. IIBEI14, *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 ir *Priestia* sp. IIIDEG93 – *Bacillota* bakterijų tipui. Nustatyta, kad *Pseudomonadota* tipe IJAK, IIBEI ir IIIDEG mėginiuose labiausiai dominavo *Rhizobium* gentis (*Pararhizobium* jam priklausantis pogentis) ir sudarė 4,8 %, 4,8 % ir 5,2 % santykinio gausumo, atitinkamai. Taip pat pagal santykinį gausumą dominavo *Haliangium* gentis, kuri IJAK sudarė 4,3 %, IIBEI ir IIIDEG po 3,2 % santykinio gausumo. Trečioje vietoje pagal santykinį gausumą IJAK rizoferos dirvožemio mėginyje dominavo *Pseudomonas* gentis (3,9 %), tuo tarpu IIBEI rizoferos dirvožemio mėginyje dominavo *Bradyrhizobium* gentis (3,1 %), o IIIDEG rizoferos dirvožemio mėginyje *Rhodoplanes* ir *Ensifer* gentys sudarydamos po 3,1 % santykinio gausumo. IJAK mėginyje likusios 17 genčių sudarė 28,8 %, IIBEI – 22,4 %, o IIIDEG likusių 16 genčių sudarė 21,6 % bendrą santykinį gausumą. Nežinomi ir nei vienai genčiai nepriskirti ar mažiau nei 0,1 % santykinio gausumo sudarę mikroorganizmai IJAK, IIBEI ir IIIDEG mėginiuose sudarė po 41,8 %, 33,5 % ir 36,2 %, atitinkamai nuo likusių bendrų santykinį gausumą (100 %) (**3.7A pav.**). Nustatyta, kad *Bacillota* bakterijų tipe IJAK, IIBEI ir IIIDEG mėginiuose labiausiai dominavo *Bacillus* gentis, kuri sudarė 43,6 %, 43,1 % ir 35,2 % santykinio gausumo. *Paenibacillus* buvo antra pagal santykinį gausumą dominuojanti *Bacillota* bakterijų tipo gentis IJAK (14,3 %), IIBEI (10,2 %) ir IIIDEG (12,7 %) *P. vulgaris* rizoferos dirvožemio mėginiuose. IJAK ir IIBEI dirvožemiuose dominavo *Tumebacillus* gentis: 1,6 % ir 9,3 %, atitinkamai. Priešingai, IIIDEG mėginyje *Tumebacillus* genties nenustatyta (0,0 %), bet šiame mėginyje dominavo *Lysinibacillus* ir *Psychrobacillus* gentys, sudarydamos po 1,9 % santykinio gausumo. IJAK mėginyje likusios 17 genčių sudarė 9,4 %, IIBEI – 14,2 %, o IIIDEG likusių 16 genčių sudarė 8,7 % nuo bendro santykinio gausumo. Nežinomi ir nei vienai genčiai nepriskirti ar mažiau nei 0,1 % santykinio gausumo sudarę mikroorganizmai IJAK, IIBEI ir IIIDEG mėginiuose sudarė po 31,1 %, 23,2 % ir 39,6 %, atitinkamai nuo likusių bendrų santykinį gausumą (100 %) (**3.7B pav.**).

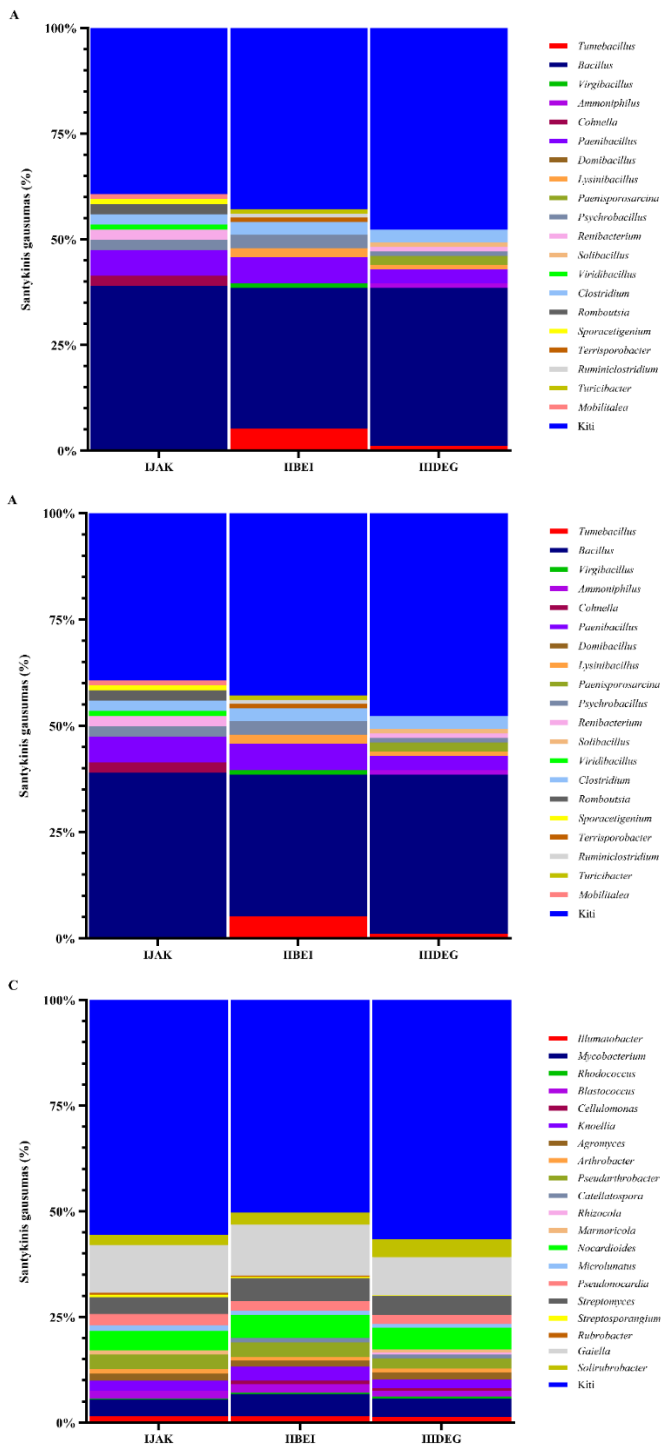


3.7 pav. *Pseudomonadota* (A) ir *Bacillota* (B) tipų ir šiems tipams priklausančių 20 labiausiai dominuojančių genčių santykinis gausumas *P. vulgaris* rizosferos dirvožemio mėginiuose IJAK, IIBEI ir IIIDEG 2021 metais.

Rezultatai parodė, kad 2022 m. tyrimo grupės izoliuoti *Bacillus* sp. IJAK27, *Priestia* sp. IIBEI32 ir *Bacillus* sp. IIIDEG45 priklauso *Bacillota* bakterijų tipui. Izoliatas *Pseudomonas* sp. IJAK44, *Pseudomonas* sp. IIBEI40 ir *Pseudomonas* sp. IIIDEG41 *Pseudomonadota* tipui, o izoliatas *Streptomyces* sp. IJAK91, *Streptomyces* sp. IIBEI-22 ir *Streptomyces* sp. IIIDEG72 *Actinomycetota* tipui ir *Streptomyces* genčiai. Tarp *Bacillota* tipo 2022 m. tyrimų grupėje taipogi labiausiai dominavo *Bacillus* (*Priestia*) gentis, kuri IJAK, IIBEI ir IIIDEG dirvožemiuose sudarė 39,0 %, 33,3 % ir 37,4 % santykinio gausumo, nurodyta tvarka. *Paenibacillus* gentis taip pat dominavo IJAK, IIBEI, IIIDEG dirvožemiuose ir sudarė 6,1 %, 6,3 % ir 3,3 % santykinio gausumo, atitinkamai. IJAK dirvožemyje net 5 skirtingos gentys sudarė po 2,4 % santykinio gausumo: *Cohnella*, *Psychrobacillus*, *Renibacterium*,

Clostridium ir *Romboutsia*. IIBEI dirvožemyje dominavo *Tumebacillus* gentis, kuri sudarė 5,4 % santykinio gausumo, o IIIDEG dirvožemyje *Clostridium* gentis, kuri sudarė 3,0 % santykinio gausumo. IJAK dirvožemyje likusios 13 labiausiai dominuojančių genčių sudarė 3,6 % santykinio gausumo. IIBEI ir IIIDEG dirvožemiuose likusios 17 labiausiai dominuojančių genčių sudarė 12,3 % ir 9,6 % santykinio gausumo, atitinkamai. Neidentifikuoti ir nei vienai genčiai nepriskirti ar mažiau nei 0,1 % santykinio gausumo sudarę mikroorganizmai IJAK, IIBEI ir IIIDEG mėginiuose sudarė po 39,3 %, 42,9 % ir 47,7 %, atitinkamai nuo likusių bendrų santykinį gausumų (100 %) (**3.8A pav.**).

Rezultatai parodė, jog *Pseudomonadota* bakterijų tipe IJAK dirvožemyje labiausiai dominavo *Amaricoccus* ir *Sphingomonas* gentys, kurios sudarė po 3,9 % santykinio gausumo, atitinkamai. Toliau dominavo *Bradyrhizobium* ir *Rhodoplanes* gentys, kurios sudarė po 2,9 % santykinio gausumo, atitinkamai. *Haliangium* gentis, pagal santykinį gausumą sudarė 2,4 %. Tuo tarpu *Pseudomonas* gentis, kuriai priklausė izoliatai sudarė vos 1,0 % santykinio gausumo. Likę 14 labiausiai dominavusių genčių IJAK dirvožemyje sudarė 18,3 % santykinio gausumo, o neidentifikuoti ir nei vienai genčiai nepriskirti ar mažiau nei 0,1 % santykinio gausumo sudarę mikroorganizmai sudarė 64,7 % nuo likusio bendro santykinio gausumo (100 %). IIBEI dirvožemyje dominavo *Rhodoplanes* gentis, kuri sudarė 3,6 % santykinio gausumo. Antroje vietoje pagal santykinį gausumą vyravo *Amaricoccus* ir *Sphingomonas* gentys, kurios sudarė po 2,8 % santykinio gausumo. Trečioje vietoje pagal santykinį gausumą vyravo net penkios gentys, kurios sudarė po 2,4 % santykinio gausumo: *Bradyrhizobium*, *Microvirga*, *Ensifer*, *Alysiosphaera* ir *Haliangium*. *Pseudomonas* gentis, kuriai priklausė izoliatai sudarė 1,6 % santykinio gausumo. Likusios 12 labiausiai dominavusių genčių sudarė 14,8 % santykinio gausumo, o neidentifikuoti ir nei vienai genčiai nepriskirti ar mažiau nei 0,1 % santykinio gausumo sudarę mikroorganizmai sudarė 62,4 % nuo likusio bendro santykinio gausumo (100 %). IIIDEG dirvožemyje daugiausiai dominavo *Amaricoccus* ir *Alysiosphaera* gentys (po 2,8 % santykinio gausumo). Antroje vietoje vyravo penkios gentys, kurios sudarė po 2,4 % santykinio gausumo: *Pedomicrobium*, *Variibacter*, *Skermanella*, *Sphingomonas* ir *Haliangium*. Trečioje vietoje pagal gausumą vyravo *Ensifer* ir *Acidibacter* gentys, kurios sudarė po 1,6 % santykinio gausumo. *Pseudomonas* gentis, kuriai priklausė izoliatai sudarė vos 0,8 % santykinio gausumo. Likusios 9 labiausiai dominavusių genčių sudarė 12,4 % santykinio gausumo, o neidentifikuoti ir nei vienai genčiai nepriskirti ar mažiau nei 1,3 % santykinio gausumo sudarę mikroorganizmai sudarė 66,0 % nuo likusio bendro santykinio gausumo (100 %) (**3.8B pav.**).



3.8 pav. *Bacillota* (A), *Pseudomonadota* (B) ir *Actinomycetota* (C) tipų ir šiems tipams priklausančių 20 labiausiai dominuojančių genčių santykinis gašumas *T. aestivum* rizosferos dirvožemio mėginiuose IJAK, IIBEI ir IIIDEG 2022 metais.

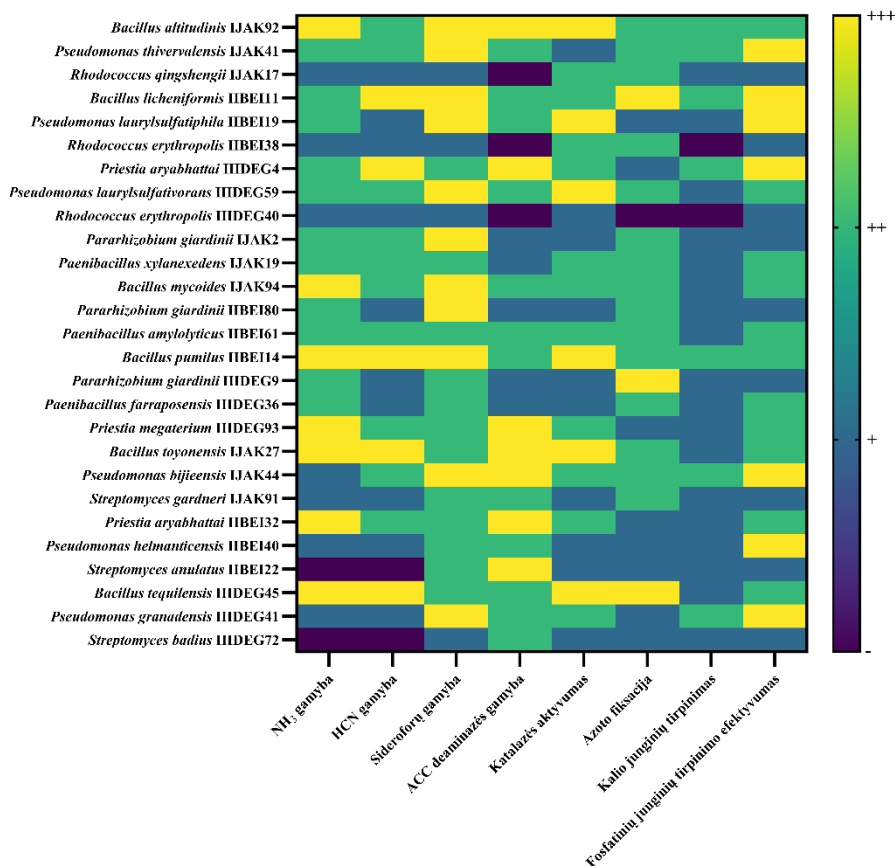
Actinomycetota tipe IJAK, IIBEI ir IIIDEG dirvožemiuose dominavo *Gaiella* gentis, kuri sudarė 11,3 %, 12,1 % ir 9,0 % santykinio gausumo, atitinkamai. Toliau dominavo *Nocardioides* gentis, kuri sudarė 4,6 %, 5,5 % ir 5,2 % santykinio gausumo, atitinkamai. Trečioje vietoje pagal santykinį gausumą dominavo *Streptomyces* gentis sudarydama 4,0 %, 5,4 % ir 4,4 % santykinio gausumo, atitinkamai. Likusių 17 bakterijų genčių santykinis gausumas kiekviename iš IJAK, IIBEI ir IIIDEG rizosferos dirvožemio mėginių sudarė atitinkamai 24,6 %, 24,7 % ir 24,8 %. Nei vienai genčiai nepriskirti ar mažiau nei 0,1 % santykinio gausumo sudarę mikroorganizmai IJAK, IIBEI ir IIIDEG mėginiuose sudarė po 55,5 %, 50,3 % ir 56,6 %, atitinkamai nuo likusių bendrų santykinų gausumų (100 %) (**3.8C pav.**).

3.4. Mikroorganizmų charakterizavimas ir atranka

3.4.1. Bendras mikroorganizmų charakterizavimas

Nustatyta, kad visi izoliatai pasižymi greitu inkubacinio augimo laiku (24–48 val. inkubacinis laikotarpis 30 °C temperatūroje). Pirmosios tyrimų grupės 9 izoliatai parodė teigiamą NH₃ išskyrimo galimybę. Geriausiu NH₃ išskyrimu pasižymėjo izoliatas *Bacillus* sp. IJAK92, taip pat ypač geru NH₃ išskyrimu pasižymėjo izoliatai *Pseudomonas* sp. IAJK41, *Bacillus* sp. IIBEI11, *Pseudomonas* sp. IIBEI19, *Priestia* sp. IIIDEG4 ir *Pseudomonas* sp. IIIDEG59 (3.10 pav.). Kiek mažesniu NH₃ išskyrimu pasižymėjo visi *Rhodococcus* genties izoliatai: *Rhodococcus* sp. IJAK17, *Rhodococcus* sp. IIBEI38 ir *Rhodococcus* sp. IIIDEG40. Geriausius rezultatus HCN išskyrimu parodė *Bacillus* sp. IIBEI11 ir *Priestia* sp. IIIDEG4, šiek tiek mažesniu HCN išskyrimu pasižymėjo *Bacillus* sp. IJAK92, *Pseudomonas* sp. IAJK41 ir *Pseudomonas* sp. IIIDEG59, o izoliatai *Rhodococcus* sp. IJAK17, *Pseudomonas* sp. IIBEI19, *Rhodococcus* sp. IIBEI38 ir *Rhodococcus* sp. IIIDEG40 – mažiausiu HCN išskyrimu. Sideroforų gamyba ypač pasižymėjo *Bacillus* ir *Pseudomonas* genčių izoliatai: *Bacillus* sp. IJAK92, *Pseudomonas* sp. IAJK41, *Bacillus* sp. IIBEI11, *Pseudomonas* sp. IIBEI19, *Pseudomonas* sp. IIIDEG59, šiek tiek mažesnius sideroforų formavimo gebėjimus parodė *Priestia* ir *Rhodococcus* genčių izoliatai: *Priestia* sp. IIIDEG4, *Rhodococcus* sp. IJAK17, *Rhodococcus* sp. IIBEI38 ir *Rhodococcus* sp. IIIDEG40. Dideliu ACC deaminazės aktyvumu pasižymėjo *Bacillus* sp. IJAK92 ir *Priestia* sp. IIIDEG4, o izoliatai *Pseudomonas* sp. IAJK41, *Bacillus* sp. IIBEI11, *Pseudomonas* sp. IIBEI19 ir *Pseudomonas* sp. IIIDEG59. Visiškai jokio ACC deaminazės aktyvumo nebuvo pastebėta izoliatuose *Rhodococcus* sp. IJAK17, *Rhodococcus* sp. IIBEI38 ir *Rhodococcus* sp. IIIDEG40. Katalazės aktyvume

labiausiai pasižymėjo *Bacillus* sp. IJAK92, *Pseudomonas* sp. IIBEI19 ir *Pseudomonas* sp. IIIDEG59. Mažesniu aktyvumu pasižymėjo *Rhodococcus* sp. IJAK17, *Bacillus* sp. IIBEI11, *Rhodococcus* sp. IIBEI38 ir *Priestia* sp. IIIDEG4, tuo tarpu izoliatai *Pseudomonas* sp. IAJK41, *Rhodococcus* sp. IIIDEG40 pasižymėjo mažiausiu aktyvumu (3.9 pav.).



3.9 pav. Bendra izoliuotų mikroorganizmų charakteristika. (+++) teigiama reakcija, (++) vidutiniška reakcija, (+) silpnai teigiama reakcija ir (-) neigiama reakcija.

Didžiausias azoto fiksacijos gebėjimas pastebėtas *Bacillus* sp. IIBEI11, šiek tiek mažesnis *Bacillus* sp. IJAK92, *Pseudomonas* sp. IAJK41, *Rhodococcus* sp. IJAK17, *Rhodococcus* sp. IIBEI38 ir *Pseudomonas* sp. IIIDEG59. Mažiausia azoto fiksacija pasižymėjo izoliatai *Pseudomonas* sp. IIBEI19 ir *Priestia* sp. IIIDEG4, o *Rhodococcus* sp. IIIDEG40 visiškai neparodė azoto fiksacijos galimybes. Kalio junginių tirpinime izoliatai neparodė ypatingai didelio aktyvumo, tačiau *Bacillus* sp. IJAK92, *Pseudomonas* sp. IAJK41, *Bacillus* sp. IIBEI11 ir *Priestia* sp. IIIDEG4 pasižymėjo didesne galimybe nei izoliatai *Rhodococcus* sp. IJAK17,

Pseudomonas sp. IIBEI19 ir *Pseudomonas* sp. IIIDEG59. Kita vertus, izoliatai *Rhodococcus* sp. IIBEI38 ir *Rhodococcus* sp. IIIDEG40 neparodė gebėjimo tirpinti netirpius fosfatinius junginius. Fosfatinių junginių tirpinime labiausiai pasižymėjo *Pseudomonas* sp. IAJK41, *Bacillus* sp. IIBEI11, *Pseudomonas* sp. IIBEI19, *Priestia* sp. IIIDEG4. Mažesniu fosfatinių junginių tirpumu pasižymėjo *Bacillus* sp. IJAK92 ir *Pseudomonas* sp. IIIDEG59, o mažiausiu – *Rhodococcus* genties izoliatai: *Rhodococcus* sp. IJAK17, *Rhodococcus* sp. IIBEI-38 ir *Rhodococcus* sp. IIIDEG40.

Antroje tyrimo grupėje, didžiausia NH_3 koncentracija pasižymėjo *Bacillus* sp. IJAK94, *Bacillus* sp. IIBEI-14 ir *Priestia* sp. IIIDEG93. Šiek tiek mažesnia NH_3 koncentracija pasižymėjo *Pararhizobium* sp. IJAK2, *Paenibacillus* sp. IJAK19, *Pararhizobium* sp. IIBEI80, *Paenibacillus* sp. IIBEI61, *Pararhizobium* sp. IIIDEG9 ir *Paenibacillus* sp. IIIDEG36. HCN išskyrimo geriausią rezultatą parodė kamienas *Bacillus* sp. IIBEI14. Silpnesnius rezultatus parodė *Pararhizobium* sp. IJAK2, *Paenibacillus* sp. IJAK19, *Bacillus* sp. IJAK94, *Paenibacillus* sp. IIBEI61 ir *Priestia* sp. IIIDEG93. Silpniausius rezultatus parodė *Pararhizobium* sp. IIBEI80, *Pararhizobium* sp. IIIDEG9 ir *Paenibacillus* sp. IIIDEG36. Sideroforų susidarymo aktyvume labiausiai dominavo *Pararhizobium* sp. IJAK2, *Bacillus* sp. IJAK94, *Pararhizobium* sp. IIBEI80, *Bacillus* sp. IIBEI14. Taip pat didelį aktyvumą rodė *Paenibacillus* sp. IJAK19, *Paenibacillus* sp. IIBEI61, *Pararhizobium* sp. IIIDEG9, *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 ir *Priestia* sp. IIIDEG93. ACC deaminazės susidaryme labiausiai pasižymėjo *Priestia* sp. IIIDEG93. Mažiau pasižymėjo *Bacillus* sp. IJAK94, *Paenibacillus* sp. IIBEI61 ir *Bacillus* sp. IIBEI14, o mažiausiai – *Pararhizobium* sp. IJAK2, *Paenibacillus* sp. IJAK19, *Pararhizobium* sp. IIBEI80, *Pararhizobium* sp. IIIDEG9 ir *Paenibacillus* sp. IIIDEG36. Didžiausias katalazės aktyvumas nustatytas *Bacillus* sp. IIBEI14, mažesnis aktyvumas *Paenibacillus* sp. IJAK19, *Bacillus* sp. IJAK94, *Paenibacillus* sp. IIBEI61 ir *Priestia* sp. IIIDEG93. Mažiausiu katalaziniu aktyvumu pasižymėjo *Pararhizobium* sp. IJAK2, *Pararhizobium* sp. IIBEI80, *Pararhizobium* sp. IIIDEG9 ir *Paenibacillus* sp. IIIDEG36. Azoto fiksavime geriausią rezultatą parodė *Pararhizobium* sp. IIIDEG9, taip pat *Pararhizobium* sp. IJAK2, *Paenibacillus* sp. IJAK19, *Bacillus* sp. IJAK94, *Pararhizobium* sp. IIBEI80, *Paenibacillus* sp. IIBEI61, *Bacillus* sp. IIBEI14 ir *Paenibacillus* sp. IIIDEG36. Mažiausiai azotą fiksavo kamienas *Priestia* sp. IIIDEG93. Kalio junginių tirpinime ryškiausiai dominavo tik *Bacillus* sp. IIBEI14, visi likę mikroorganizmai parodė mažą aktyvumą. Fosfatinių junginių tirpinime geriausius rezultatus parodė *Paenibacillus* sp. IJAK19, *Bacillus* sp. IJAK94, *Paenibacillus* sp. IIBEI61, *Bacillus* sp. IIBEI14, *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 ir *Priestia* sp. IIIDEG93. Mažiausią fosfatinių

junginių tirpinimo potencialą parodė *Pararhizobium* genties izoliatai: *Pararhizobium* sp. IJAK2, *Pararhizobium* sp. IIBEI80 ir *Pararhizobium* sp. IIIIDEG9 (3.9 pav.).

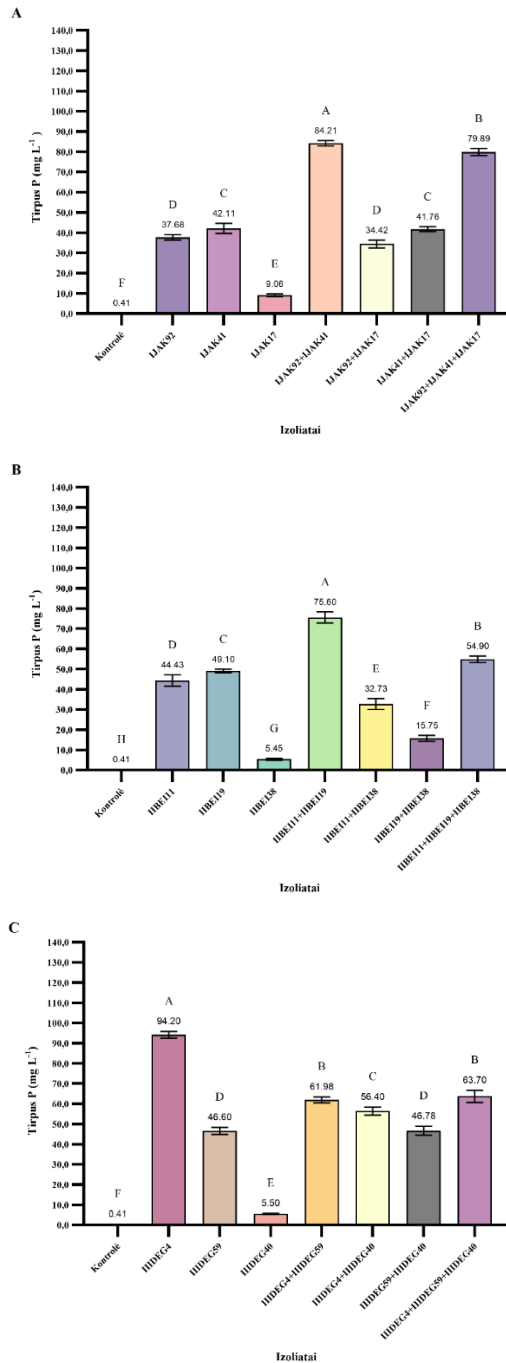
Trečioje grupėje septyni mikroorganizmai parodė teigiamus NH_3 gamybos rezultatus. Kamieniai *Bacillus* sp. IJAK27, *Prestia* sp. IIBEI32 ir *Bacillus* sp. IIIIDEG45 buvo didžiausi NH_3 gamintojai iš visų devynių izoliatų. Mažą aktyvumą parodė *Pseudomonas* sp. IJAK44, *Streptomyces* sp. IJAK91, *Pseudomonas* sp. IIBEI40 ir *Pseudomonas* sp. IIIIDEG41. Visiško aktyvumo neparodė *Streptomyces* sp. IIBEI22 ir *Streptomyces* sp. IIIIDEG72. Didžiausia HCN gamyba aptikta izoliatuose *Bacillus* sp. IJAK27 ir *Bacillus* sp. IIIIDEG45 ir šiek tiek mažesnė *Pseudomonas* sp. IJAK44 ir *Prestia* sp. IIBEI32, o mažiausią - *Streptomyces* sp. IJAK91, *Pseudomonas* sp. IIBEI40 ir *Pseudomonas* sp. IIIIDEG41. Visiškai jokio spalvos pokyčio nebuvo nustatyta HCN aptikimo eksperimente, atliktame su kamienais *Streptomyces* sp. IIBEI22 ir *Streptomyces* sp. IIIIDEG72. Atliekant sideroforų išskyrimo eksperimentą, visuose devyniuose kamieniuose buvo pastebėta geltonos spalvos aureolė aplink bakterijų kolonijas, auginamas CAS lėkštelėse su agarizuota terpe. Šis rezultatas rodo, kad visi izoliatai gali išskirti sideroforus, ypač *Pseudomonas* sp. IJAK44 ir *Pseudomonas* sp. IIIIDEG41. Tuo tarpu izoliatas *Streptomyces* sp. IIIIDEG72 parodė mažiausią sideroforų susiformavimo galimybę. ACC deaminaze labiausiai pasižymėjo *Bacillus* sp. IJAK27, *Pseudomonas* sp. IJAK44, *Prestia* sp. IIBEI32 ir *Streptomyces* sp. IIBEI22. Šiek tiek mažesniu susidarymu pasižymėjo likę izoliatai: *Streptomyces* sp. IJAK91, *Pseudomonas* sp. IIBEI40, *Bacillus* sp. IIIIDEG45, *Pseudomonas* sp. IIIIDEG41 ir *Streptomyces* sp. IIIIDEG72. Katalazės aktyvumo nustatyme ryškus deguonies burbuliukų susidarymas buvo pastebėtas kamieniuose *Bacillus* sp. IJAK27 ir *Bacillus* sp. IIIIDEG45, o mažesnis – *Pseudomonas* sp. IJAK44, *Prestia* sp. IIBEI32, *Pseudomonas* sp. IIIIDEG41. Izoliatai *Streptomyces* sp. IJAK91, *Pseudomonas* sp. IIBEI40, *Streptomyces* sp. IIBEI22 ir *Streptomyces* sp. IIIIDEG72 pasižymėjo sąlyginai mažu aktyvumu. Izoliatas *Bacillus* sp. IIIIDEG45 parodė teigiamą augimą beazotinėje mitybinėje agarų terpėje ir sustiprino mėlyną BTB spalvą aplink susiformavusią koloniją. Azoto fiksavimo potencialu pasižymėjo ir *Bacillus* sp. IJAK27, *Pseudomonas* sp. IJAK44 ir *Streptomyces* sp. IJAK91. Maža azoto fiksavimo galimybė pasižymėjo *Prestia* sp. IIBEI32, *Pseudomonas* sp. IIBEI40, *Streptomyces* sp. IIBEI22, *Pseudomonas* sp. IIIIDEG41 ir *Streptomyces* sp. IIIIDEG72. *Pseudomonas* sp. IJAK44 ir *Pseudomonas* sp. IIIIDEG41 kamieniai pasižymėjo ryškiomis kalio tirpimo zonomis ir sudarė geltoną spalvą aplink susiformavusias kolonijas Aleksandrow Agar terpėje. Menką aktyvumą parodė visi kiti likę kamieniai: *Bacillus* sp. IJAK27,

Streptomyces sp. IJAK91, *Prestia* sp. IIBEI32, *Pseudomonas* sp. IIBEI40, *Streptomyces* sp. IIBEI22, *Bacillus* sp. IIIDEG45, *Pseudomonas* sp. IIIDEG41 ir *Streptomyces* sp. IIIDEG72. Nustatant fosfatinių junginių tirpinimo potencialą po 7 dienų inkubacinio laikotarpio aplink izoliatų kolonijas buvo pastebėta susiformavusi skaidri zona. Ryškiausia zona nustatyta *Pseudomonas* genties izoliatuose: *Pseudomonas* sp. IJAK44, *Pseudomonas* sp. IIBEI40 ir *Pseudomonas* sp. IIIDEG41. Mažesnis aktyvumas pastebėtas *Bacillus* ir *Priestia* genties izoliatuose: *Bacillus* sp. IJAK27, *Prestia* sp. IIBEI32 ir *Bacillus* sp. IIIDEG45. Mažiausią aktyvumą parodė *Streptomyces* sp. IJAK91, *Streptomyces* sp. IIBEI22 ir *Streptomyces* sp. IIIDEG72 kamienai (**3.9 pav.**).

3.4.2. Mikroorganizmų gebėjimas tirpinti netirpų akmens fosfatą ir organinių rūgščių analizė

Pirmoje 2020 m. tyrimo grupėje mikroorganizmų *Bacillus* sp. IJAK92, *Pseudomonas* sp. IJAK41 ir *Rhodococcus* sp. IJAK17 (toliau analizėje naudojami tik kamienų numeriai) gebėjimas ištirpinti nuosėdinę uolieną, t. y. fosforitą iš Maroko, svyravo nuo 9,06 iki 84,21 mg L⁻¹. Sudaryti septyni skirtingi bandymo variantai: IJAK92, IJAK41, IJAK17, IJAK92 + IJAK41, IJAK92 + IJAK17, IJAK41 + IJAK17 ir IJAK92 + IJAK41 + IJAK17. Nustatyta, kad po 30 parų inkubacinio periodo tyrimo variantas IJAK92 + IJAK41 parodė didžiausią tirpaus fosforo koncentraciją mitybinėje terpėje (84,21 mg L⁻¹). Šiek tiek mažesnę tirpaus P koncentraciją parodė trijų mikroorganizmų mišinys IJAK92 + IJAK41 + IJAK17 (79,89 mg L⁻¹). Tačiau ryškaus P koncentracijų skirtumo nepastebėta tarp variantų IJAK41 (42,11 mg L⁻¹) ir IJAK41 + IJAK17 (41,76 mg L⁻¹) bei tarp variantų IJAK92 (37,68 mg L⁻¹) ir IJAK92 + IJAK17 (34,42 mg L⁻¹), o mažiausia tirpaus P koncentracija aptikta terpėje su variantu IJAK17 (9,06 mg L⁻¹) (**3.10A pav.**).

Antroje 2020 m. tyrimų grupėje *Bacillus* sp. IIBEI11, *Pseudomonas* sp. IIBEI19, *Rhodococcus* sp. IIBEI38 (toliau analizėje naudojami tik kamienų numeriai) sudarė IIBEI11, IIBEI19, IIBEI38, IIBEI11 + IIBEI19, IIBEI11 + IIBEI38, IIBEI19 + IIBEI38 ir IIBEI11 + IIBEI19 + IIBEI38 eksperimento variantus, o šių eksperimentų terpių mėginiuose ištirpusio P koncentracija svyravo nuo 5,45 iki 75,60 mg L⁻¹. Nustatyta, jog didžiausia tirpaus P koncentracija aptikta terpėje su variantu IIBEI11 + IIBEI19 (75,60 mg L⁻¹). Toliau sekė terpė su bandymo variantais IIBEI11 + IIBEI19 + IIBEI38 (54,90 mg L⁻¹), IIBEI19 (49,10 mg L⁻¹), IIBEI11 (44,43 mg L⁻¹), IIBEI11 + IIBEI38 (32,73 mg L⁻¹), IIBEI19 + IIBEI38 (15,75 mg L⁻¹) ir IIBEI38 (5,45 mg L⁻¹) (**3.10B pav.**).

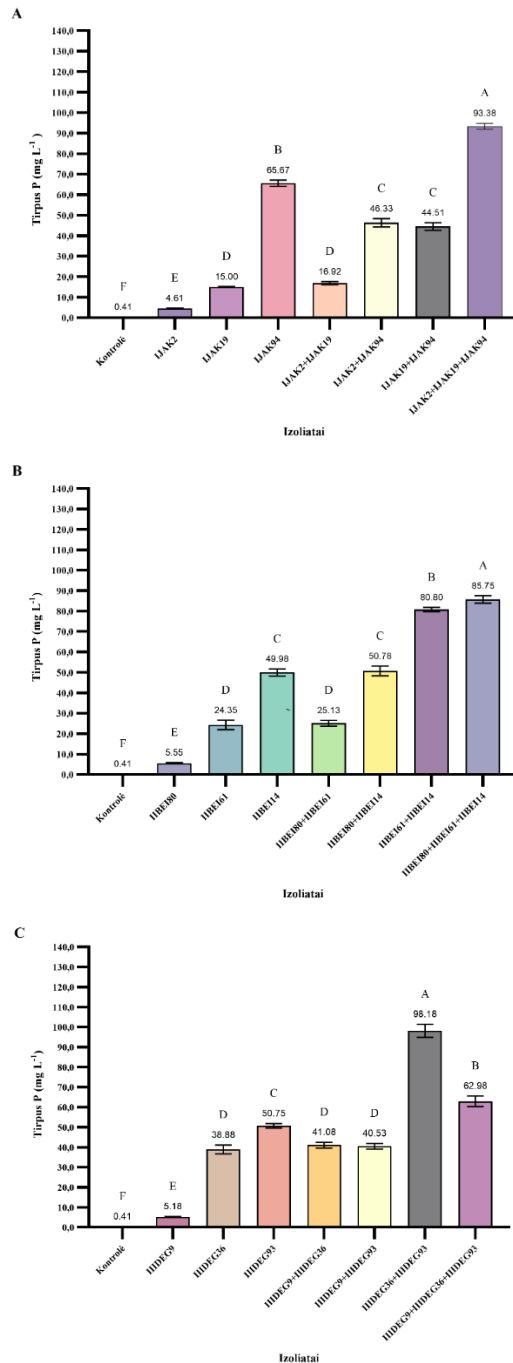


3.10 pav. I grupės izoliatų viengubos, dvigubos ir trigubos inokuliacijos įtaka MF tirpinimui modifikuotoje NBRIP skystoje terpėje (A–C). Skirtumai tarp vidutinių tirpinimo gebėjimų auginimo terpėje yra statistiškai reikšmingi pagal vienspūš ANOVA ($p < 0,05$). Vertikalios juostos rodo paklaidų intervalus, kurių patikimumo lygis yra 95 % ($n = 3$). Tos pačios raidės rodo, kad skirtumai tarp vidurkių nėra statistiškai reikšmingi (Tukey HSD post hoc testas).

Trečiosios 2020 m. tyrimo grupės mikroorganizmai *Priestia* sp. IIIDEG4, *Pseudomonas* sp. IIIDEG59, *Rhodococcus* sp. IIIDEG40 (toliau analizėje naudojami tik kamienų numeriai) sudarė kitus septynis eksperimento variantus: IIIDEG4, IIIDEG59, IIIDEG40, IIIDEG4+IIIDEG59, IIIDEG4 + IIIDEG40, IIIDEG59 + IIIDEG40 ir IIIDEG4 + IIIDEG59 + IIIDEG40. Šių variantų mėginiuose ištirpusio P koncentracijos diapazonas svyravo nuo 5,50 iki 94,20 mg L⁻¹. Didžiausia P koncentracija terpėje aptikta su variantu IIIDEG4 (94,20 mg L⁻¹), o visi kiti bandymo variantai nurodyti mažėjimo tvarka: IIIDEG4 + IIIDEG59 + IIIDEG40 (63,70 mg L⁻¹) ir IIIDEG4 + IIIDEG59 (61,98 mg L⁻¹), IIIDEG4 + IIIDEG40 (56,40 mg L⁻¹), IIIDEG59 + IIIDEG40 (46,78 mg L⁻¹) ir IIIDEG59 (46,60 mg L⁻¹), IIIDEG40 (5,50 mg L⁻¹) (**3.10C pav.**). Visose tyrimo grupėse kaip 8 mėginys naudota kontrolė (mitybinė terpė be jokių ląstelių inokuliavimo).

Pirmoje 2021 m. tyrimo grupėje mikroorganizmų *Pararhizobium* sp. IJAK2, *Paenibacillus* sp. IAJK19 ir *Bacillus* sp. IJAK94 (toliau analizėje naudojami tik kamienų numeriai) gebėjimas ištirpinti nuosėdinę uolieną, t. y. fosforitą iš Maroko, svyravo nuo 4,61 iki 93,38 mg L⁻¹. Geriausią rezultatą parodė bendra IAJK2 + IJAK19 + IJAK94 inokuliacija (93,38 mg L⁻¹). Taip pat gerą rezultatą P tirpinime parodė vienguba inokuliacija su IJAK94 (65,67 mg L⁻¹). Tuo tarpu nepastebėta reikšmingų skirtumų P koncentracijoje tarp bendros inokuliacijos IJAK2 + IJAK94 mišiniu ir bendros inokuliacijos IJAK19 + IJAK94 mišiniu (46,33 ir 44,51 mg L⁻¹, atitinkamai). Taip pat reikšmingų skirtumų nepastebėta ir tarp bendros inokuliacijos IJAK2 + IJAK19 ir viengubos inokuliacijos su IJAK19 (16,92 ir 15,00 mg L⁻¹, atitinkamai). Žemiausia P koncentracija nustatyta naudojant viengubą IJAK2 inokuliaciją (4,61 mg L⁻¹) (**3.11A pav.**).

Antroje tyrimo grupėje izoliatų *Pararhizobium* sp. IIBEI80, *Paenibacillus* sp. IIBEI61 ir *Bacillus* sp. IIBEI14 (toliau analizėje naudojami tik kamienų numeriai) tirpaus P koncentracija svyravo nuo 5,55 iki 85,75 mg L⁻¹. Didžiausia tirpaus P koncentracija aptikta mėginyje, kurioje buvo naudota bendra inokuliacija iš trijų mikroorganizmų IIBEI80 + IIBEI61 + IIBEI14 (85,75 mg L⁻¹). Bendra inokuliacija su IIBEI61 ir IIBEI14 taipogi parodė gerus MF tirpinimo rezultatus – tirpaus P koncentracija mėginyje siekė 80,80 mg L⁻¹. Reikšmingo koncentracijos skirtumo nepastebėta tarp dviejų variantų: bendros inokuliacijos IIBEI80 + IIBEI14 (50,78 mg L⁻¹) ir viengubos inokuliacijos su IIBEI14 (49,98 mg L⁻¹). Taip pat reikšmingo skirtumo nepastebėta tarp bendros inokuliacijos IIBEI80 + IIBEI61 (25,13 mg L⁻¹) ir viengubos inokuliacijos su IIBEI61 (24,35 mg L⁻¹). Žemiausia P koncentracija nustatyta taikant viengubą IIBEI80 inokuliaciją (5,55 mg L⁻¹) (**3.11B pav.**).

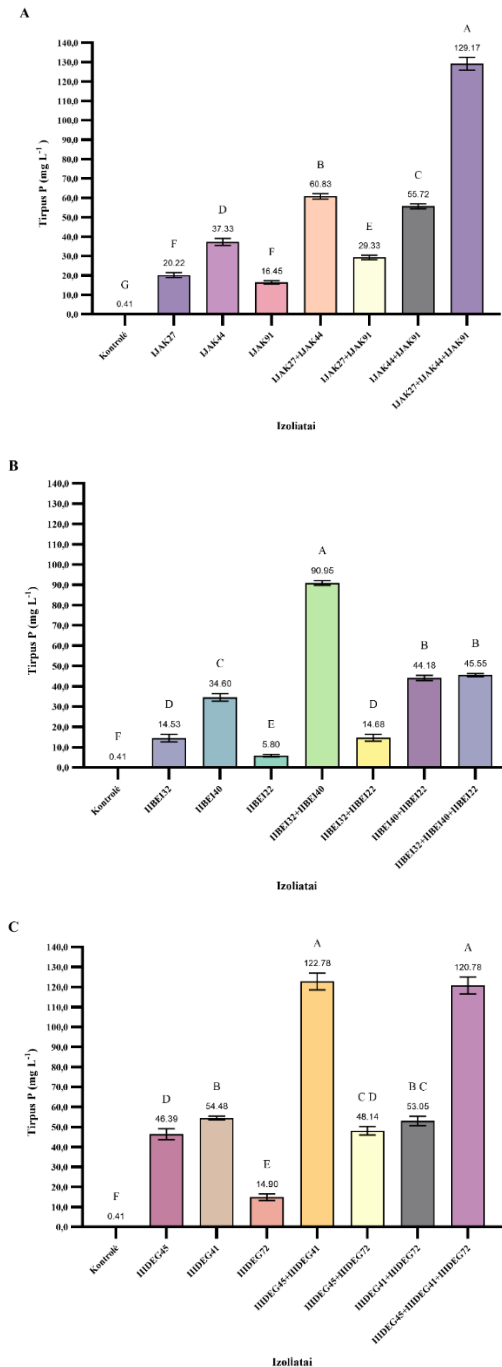


3.11 pav. II grupės izoliatų viengubos, dvigubos ir trigubos inokuliacijos įtaka MF tirpinimui modifikuotoje NBRIP skystoje terpėje (A–C). Skirtumai tarp vidutinių tirpinimo gebėjimų auginimo terpėje yra statistiškai reikšmingi pagal vienspūš ANOVA ($p < 0,05$). Vertikalios juostos rodo paklaidų intervalus, kurių patikimumo lygis yra 95 % ($n = 3$). Tos pačios raidės rodo, kad skirtumai tarp vidurkių nėra statistiškai reikšmingi (Tukey HSD post hoc testas).

Trečioje grupėje mikroorganizmų *Pararhizobium* sp. IIIDEG9, *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 ir *Bacillus* sp. IIIDEG93 (toliau analizėje naudojami tik kamienų numeriai) tirpaus P diapazonas svyravo nuo 5,18 iki 98,18 mg L⁻¹. Didžiausia P koncentracija nustatyta dvigubos inokuliacijos variante IIIDEG36 + IIIDEG93 (98,18 mg L⁻¹). Sekantis mėginys, kuriame nustatyta 62,98 mg L⁻¹ tirpaus P koncentracija buvo bendra IIIDEG9 + IIIDEG36 + IIIDEG93 inokuliacija. IIIDEG93 vienguba inokuliacija davė 50,75 mg L⁻¹ rezultata. Trys mėginiai neparodė reikšmingo tirpaus P koncentracijos skirtumo: IIIDEG9 + IIIDEG36, IIIDEG9 + IIIDEG93 ir vienguba inokuliacija su IIIDEG36 (41,08, 40,53 ir 38,88 mg L⁻¹, atitinkamai). Žemiausia P koncentracija nustatyta vienguba IIIDEG9 inokuliacija (5,18 mg L⁻¹) (**3.11C pav.**).

Pirmosios 2022 m. tyrimų grupės izoliatų *Bacillus* sp. IJAK27, *Pseudomonas* sp. IJAK44 ir *Streptomyces* sp. IJAK91 (toliau analizėje naudojami tik kamienų numeriai) gebėjimas tirpinti MF svyravo nuo 16,45 iki 129,17 mg L⁻¹. Bendra visų trijų IJAK27 + IJAK44 + IJAK91 mikroorganizmų koinokuliacija parodė didžiausią tirpaus P koncentraciją po 30 dienų inkubacijos laikotarpio (129,17 mg L⁻¹). Bendras IJAK27 + IJAK44 ir IJAK44 + IJAK91 inokuliacijos taip pat parodė didelį P tirpinimo gebėjimą: 60,83 mg L⁻¹ ir 55,72 mg L⁻¹, atitinkamai. Kita vertus, vienintelė IJAK44 inokuliacija parodė geresnius fosfato tirpinimo rezultatus (37,33 mg L⁻¹) nei bendra IJAK27 + IJAK91 inokuliacija (29,33 mg L⁻¹). Galiausiai, vienguba IJAK27 ir vienguba IJAK91 inokuliacija parodė statistiškai mažesnę P tirpinimo gebėjimą: 20,22 mg L⁻¹ ir 16,45 mg L⁻¹, atitinkamai (**3.12A pav.**).

Antroje 2022 m. tyrimo grupėje trijų izoliatų *Bacillus* sp. IIBEI32, *Pseudomonas* sp. IIBEI40 ir *Streptomyces* sp. IIBEI22 (toliau analizėje naudojami tik kamienų numeriai) MF tirpinimas skystoje NBRIP terpėje svyravo nuo 5,80 iki 90,95 mg L⁻¹. Variantas IIBEI32 + IIBEI40 parodė maksimalias P tirpinimo galimybes (90,95 mg L⁻¹), o kitos dvi koinokuliacijos su IIBEI32 + IIBEI40 + IIBEI22 ir IIBEI40 + IIBEI22 taip pat parodė reikšmingus P tirpinimo rezultatus, nors statistiškai reikšmingų skirtumų tarp abiejų tyrimo variantų nenustatyta (45,55 mg L⁻¹ ir 44,18 mg L⁻¹, atitinkamai). Vienguba IIBEI40 inokuliacija turėjo žymiai didesnę P tirpinimo galimybę (34,60 mg L⁻¹) nei bendra IIBEI32 + IIBEI22 inokuliacija. Variantai su IIBEI32 + IIBEI22 koinokuliacija ir vienguba IIBEI32 inokuliacija parodė nedidelę P tirpinimo galimybę ir nereikšmingą koncentracijos skirtumą (14,68 mg L⁻¹ ir 14,53 mg L⁻¹, atitinkamai). Priešingai, apdorojimas vienguba IIBEI22 inokuliacija turėjo mažiausią (5,80 mg L⁻¹) tirpinimo galimybę (**3.12B pav.**).



3.12. pav. III grupės izoliatų viengubos, dvigubos ir trigubos inokuliacijos įtaka MF tirpinimui modifikuotoje NBRIP skystoje terpėje (A–C). Skirtumai tarp vidutinių tirpinimo gebėjimų auginimo terpėje yra statistiškai reikšmingi pagal vienus ANOVA ($p < 0,05$). Vertikalios juostos rodo paklaidų intervalus, kurių patikimumo lygis yra 95 % ($n = 3$). Tos pačios raidės rodo, kad skirtumai tarp vidurkių nėra statistiškai reikšmingi (Tukey HSD post hoc testas).

Paskutinėje 2022 m. grupėje *Bacillus* sp. IIIIDEG45, *Pseudomonas* sp. IIIIDEG41 ir *Streptomyces* sp. IIIIDEG72 (toliau analizėje naudojami tik kamienų numeriai) tirpaus P koncentracijos svyravo nuo 14,90 iki 122,78 mg L⁻¹. Šioje eksperimento grupėje geriausius rezultatus pavyko pasiekti naudojant dvi koinokuliavimo parinktis – IIIIDEG45 + IIIIDEG41 ir IIIIDEG45 + IIIIDEG41 + IIIIDEG72 (122,78 mg L⁻¹ ir 120,78 mg L⁻¹, atitinkamai). Viengubas IIIIDEG41 inokuliavimas ir bendras IIIIDEG41 + IIIIDEG72 koinokuliavimas parodė nereikšmingą tarpusavio skirtumą (54,48 mg L⁻¹ ir 53,05 mg L⁻¹, atitinkamai). Tačiau bendras IIIIDEG41 + IIIIDEG72 inokuliavimas taip pat parodė nereikšmingą skirtumą palyginus su bendru IIIIDEG45 + IIIIDEG72 inokuliavimu (48,14 mg L⁻¹). Kita vertus, nebuvo pastebėta jokie skirtumo tarp bendros inokuliacijos su IIIIDEG45 + IIIIDEG72 ir viengubos inokuliacijos su IIIIDEG45 (46,39 mg L⁻¹), o IIIIDEG72 parodė statistiškai mažiausią gebėjimą P tirpinime (14,90 mg L⁻¹) (**3.12C pav.**).

Pagal gautus 2020–2022 m. tyrimo rezultatus išsamesniems tyrimams atlikti iš kiekvienų tyrimo metų ir kiekvienos tyrimo grupės buvo pasirinkta po vieną (ar du reikšmingo skirtumo neparodžiusius) variantus, kurie parodė geriausius rezultatus P tirpinimo eksperimentuose. Iš 2020 m. tyrimo pasirinkti trys variantai: IJAK92 + IJAK41 (84,21 mg L⁻¹), IIBEI11 + IIBEI19 (75,60 mg L⁻¹) bei IIIIDEG4 (94,20 mg L⁻¹); iš 2021 m. pasirinkti trys variantai: IJAK2 + IJAK19 + IJAK94 (93,38 mg L⁻¹), IIBEI80 + IIBEI61 + IIBEI14 (85,75 mg L⁻¹) ir IIIIDEG9 + IIIIDEG36 + IIIIDEG93 (98,18 L⁻¹); iš 2022 m. pasirinkti keturi variantai: IJAK27 + IJAK44 + IJAK91 (129,17 mg L⁻¹), IIBEI32 + IIBEI40 (90,95 mg L⁻¹), IIIIDEG45 + IIIIDEG41 (122,78 mg L⁻¹) ir IIIIDEG45 + IIIIDEG41 + IIIIDEG72 (120,78 mg L⁻¹).

Organinių rūgščių detekcijos metu įvertintas mikroorganizmų gebėjimas išskirti organines rūgštis, tokias kaip pieno, acto, gliukono, obuolių, oksalo ir citrinos rūgštys. Vertinant organinių rūgščių koncentracijas nustatyta, kad pirmoje 2020 m. tyrimo grupėje didžiausias organinių rūgščių kiekis nustatytas bandyme su vienguba *Priestia* sp. IIIIDEG4 inokuliacija. Pieno rūgšties koncentracija šiame eksperimente siekė 419,0 µg mL⁻¹, o taip pat didelėmis koncentracijomis pasižymėjo ir gliukono (287,0 µg mL⁻¹) bei obuolių (232,0 µg mL⁻¹) rūgštys. Oksalo, acto ir citrinos rūgštys sudarė 34,0 µg mL⁻¹, 21,0 µg mL⁻¹ ir 13,5 µg mL⁻¹, atitinkamai (**3.5 lentelė**).

3.5 lentelė. Organinių rūgščių NBRIP terpės supernatante analizės rezultatai naudojant HPLC Dionex Ultimate 3000-4.

Mėginio pavadinimas	Pieno rūgštis	Acto rūgštis	Gliukono rūgštis	Obuolių rūgštis	Oksalo rūgštis	Citrinos rūgštis
	Koncentracija, $\mu\text{g mL}^{-1}$					
Kontrolė	$8,0 \pm 1,0\text{i}$	$5,0 \pm 0,2\text{h}$	N/A [†]	N/A	N/A	$0,05 \pm 0,1\text{g}$
IJAK92 + IJAK41	$219,0 \pm 5,0\text{h}$	$11,0 \pm 2,0\text{f}$	$77,0 \pm 5,0\text{gh}$	$19,0 \pm 2,0\text{f}$	$17,0 \pm 2,0\text{c}$	$2,0 \pm 0,5\text{fg}$
IIIBEI11 + IIIBEI19	$309,0 \pm 13,0\text{f}$	$16,0 \pm 2,0\text{e}$	$111,0 \pm 7,0\text{e}$	$89,0 \pm 4,0\text{d}$	$1,7 \pm 0,2\text{f}$	$7,0 \pm 1,0\text{ef}$
IIIDEG4	$419,0 \pm 3,0\text{cd}$	$21,0 \pm 2,0\text{cd}$	$287,0 \pm 13,0\text{a}$	$232,0 \pm 7,0\text{a}$	$34,0 \pm 2,0\text{b}$	$13,5 \pm 0,6\text{cd}$
IJAK2 + IJAK19 + IJAK94	$227,0 \pm 3,0\text{h}$	$9,0 \pm 1,0\text{fg}$	$69,0 \pm 17,0\text{h}$	$101,0 \pm 6,0\text{c}$	$11,0 \pm 3,0\text{d}$	$5,0 \pm 2,0\text{eg}$
IIIBEI80 + IIIBEI61 + IIIBEI14	$249,0 \pm 6,0\text{g}$	$17,0 \pm 3,0\text{de}$	$155,0 \pm 9,0\text{d}$	$34,0 \pm 2,0\text{e}$	$7,0 \pm 1,0\text{e}$	$15,0 \pm 2,0\text{c}$
IIIDEG36 + IIIDEG93	$433,0 \pm 11,0\text{c}$	$27,0 \pm 3,0\text{b}$	$222,0 \pm 9,0\text{b}$	$147,0 \pm 5,0\text{b}$	$44,0 \pm 3,0\text{a}$	$14,0 \pm 5,0\text{cd}$
IJAK27 + IJAK44 + IJAK91	$567,0 \pm 13,0\text{a}$	$35,0 \pm 2,0\text{a}$	$180,0 \pm 7,0\text{c}$	$140,0 \pm 7,0\text{b}$	$1,2 \pm 0,2\text{f}$	$33,5 \pm 6,0\text{a}$
IIIBEI32 + IIIBEI40	$399,0 \pm 7,0\text{e}$	$25,5 \pm 4,0\text{bc}$	$108,0 \pm 5,0\text{e}$	$105,0 \pm 5,0\text{c}$	$1,0 \pm 0,5\text{f}$	$27,0 \pm 0,2\text{b}$
IIIDEG45 + IIIDEG41	$455,0 \pm 15,0\text{b}$	$35,0 \pm 2,0\text{a}$	$88,0 \pm 3,0\text{fg}$	$11,0 \pm 3,0\text{fg}$	$0,7 \pm 0,2\text{f}$	$5,0 \pm 1,0\text{eg}$
IIIDEG45 + IIIDEG41 + IIIDEG72	$405,0 \pm 7,0\text{de}$	$33,5 \pm 3,0\text{a}$	$101,5 \pm 2,0\text{ef}$	$6,0 \pm 2,0\text{g}$	$1,3 \pm 0,1\text{f}$	$9,0 \pm 0,8\text{de}$

[†]N/A – neaptikta arba aptikta labai mažomis koncentracijomis.

2021 m. tyrimo grupėje gauti rezultatai parodė, kad didžiausias organinių rūgščių koncentracijos nustatytos bandyme su dviejų mikroorganizmų *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 + *Priestia* sp. IIIDEG93 inokuliacija. Nustatyta, kad šiame variante didžiausia organinės rūgšties koncentracija ($433,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) buvo pieno rūgšties. Taip pat nustatytos didelės gliukono ir obuolių rūgščių koncentracijos (atitinkamai $222,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ir $147,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Oksalo, acto ir citrinos rūgštys sudarė atitinkamai $44,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, $27,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ir $14,0 \mu\text{g mL}^{-1}$.

2022 m. tyrimo grupėje parodyta, kad didžiausias organinių rūgščių koncentracijas pasiekė bendros trijų mikroorganizmų *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91 inokuliacijos bandymas. Nustatyta, kad didžiausia organinės rūgšties koncentracija ($567,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) buvo pieno rūgšties. Taip pat koncentracijose dominavo gliukono ir obuolių rūgštys ($180,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ir $140,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, atitinkamai). Acto, citrinos ir oksalo rūgštys sudarė $35,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, $33,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ir $1,2 \mu\text{g mL}^{-1}$, atitinkamai **(3.5 lentelė)**.

Tolimesniame etape, remiantis gautais rezultatais, detalesniems tyrimams atlikti pasirinkti trys bandymo variantai: vienguba inokuliacija su *Priestia* sp. IIIDEG4, bendra inokuliacija su *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 + *Priestia* sp. IIIDEG93 ir bendra inokuliacija su *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91.

3.5. Mitybinės terpės sudėties bei augimo sąlygų optimizavimas laboratorinio lygio EDF 5.4_1 bioreaktoriuose

Siekiant įvertinti anglies šaltinio tinkamumą *Priestia* sp. IIIDEG4 izoliato ląstelių dalijimuisi mitybinėje terpėje buvo pasirinkti penki skirtingi anglies turintys substratai. Gliukozė, sacharozė, krakmolas, glicerolis ir melasa buvo naudojami lygiomis dalimis keičiant mitybinės terpės sudėtyje vieną iš šių substratų. Po 48 val. inkubacijos laikotarpio buvo nustatytas *Priestia* sp. IIIDEG4 ląstelių optinis tankis esant 600 nm bangos ilgiui: 0,81, 0,76, 0,45, 0,61 ir 0,92, atitinkamai, o KfV mL^{-1} sudarė atitinkamai $5,8 \times 10^7$, $6,0 \times 10^7$, $3,4 \times 10^7$, $4,9 \times 10^7$ ir $9,5 \times 10^7$. Šie rezultatai parodė, kad melasa buvo tinkamiausias anglies turintis substratas mitybinėje terpėje **(3.13A pav.)**.

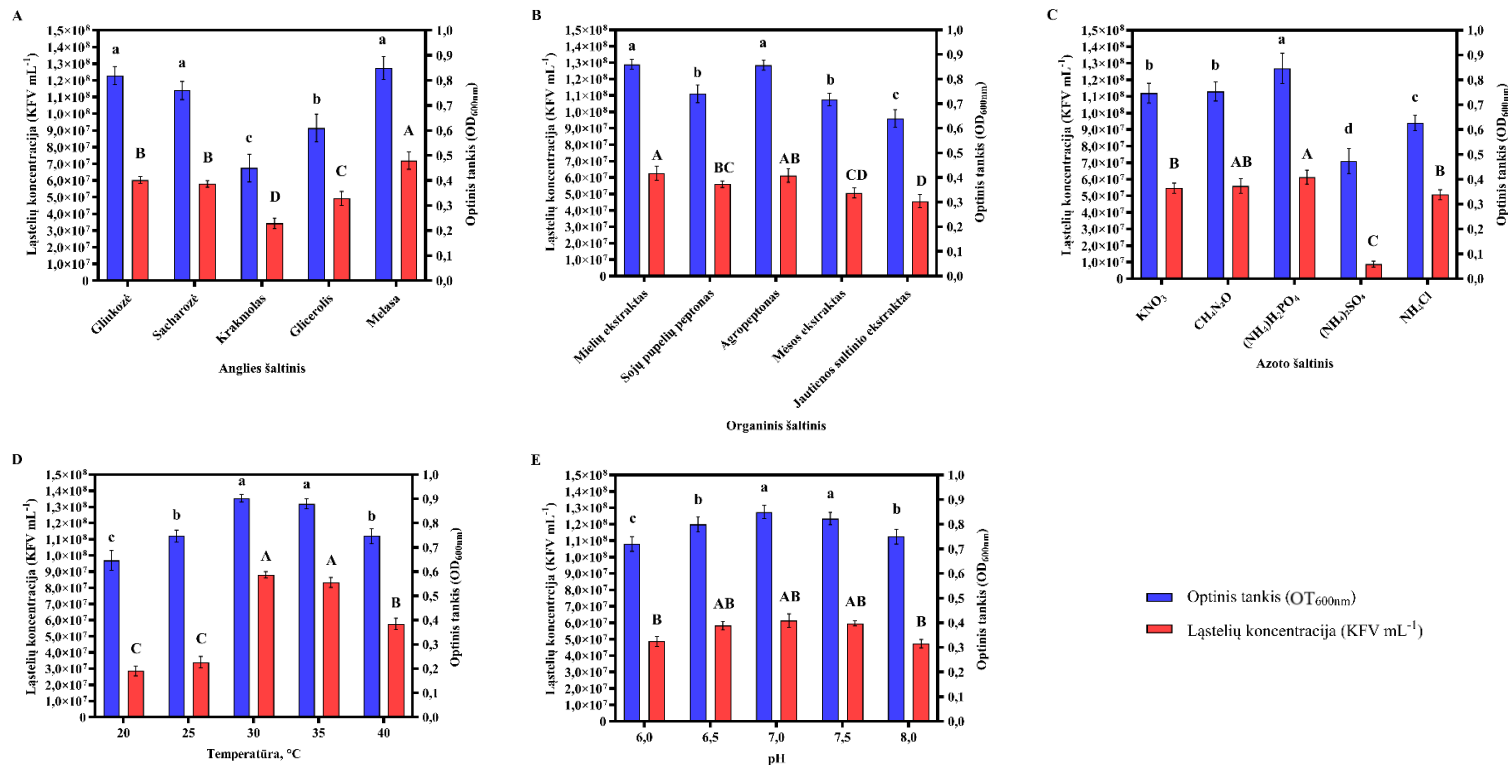
Siekiant nustatyti organinį azoto šaltinį mitybinėje terpėje buvo naudoti šie substratai: mielių ekstrakto milteliai, sojų pupelių peptonas, agropeptonas, mėsos ekstrakto milteliai ir jaučio sultinio milteliai. Izoliato *Priestia* sp. IIIDEG4 OT_{600nm} buvo atitinkamai 0,86, 0,74, 0,86, 0,72 ir 0,64, tuo tarpu KfV mL^{-1} siekė atitinkamai $6,3 \times 10^7$, $5,6 \times 10^7$, $6,1 \times 10^7$, $5,1 \times 10^7$ ir $4,6 \times 10^7$). Šie rezultatai parodė nedidelį ląstelių prieaugio skirtumą tarp dviejų

substratų: mielių ekstrakto miltelių ir agropeptono, tačiau mielių ekstraktas buvo pasirinktas kaip organinis šaltinis tolesniam tyrimui dėl geresnio medžiagos tirpumo ir mažesnio nuosėdų susidarymo mitybinėje terpėje **(3.13B pav.)**.

Augimo sąlygų įvertinimas su įvairiais neorganiniais azoto turinčiais substratais, įskaitant KNO_3 , $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl siekė atitinkamai 0,75, 0,75, 0,84, 0,47 ir 0,63 esant $\text{OT}_{600\text{ nm}}$, o KfV mL^{-1} siekė atitinkamai $5,5 \times 10^7$, $5,6 \times 10^7$, $6,1 \times 10^7$, $8,8 \times 10^6$ ir $5,1 \times 10^7$. Gauti rezultatai parodė, kad optimaliausias IIIDEG4 ląstelių dalijimasis vyksta kaip neorganinį azoto šaltinį mitybinėje terpėje naudojant $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$. Priešingai, naudojant $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ląstelių dalijimasis buvo menkas, o mitybinėje terpėje mikroskopiškai buvo matyti skaidrios struktūros *Priestia* sp. IIIDEG4 ląstelės **(3.13C pav.)**.

Temperatūros įtaka *Priestia* sp. IIIDEG izoliato ląstelių dalijimuisi prie 20, 25, 30, 35 ir 40 °C temperatūros buvo atitinkamai 0,65, 0,75, 0,90, 0,88 ir 0,75 esant $\text{OT}_{600\text{ nm}}$ ir $2,9 \times 10^7$, $3,4 \times 10^7$, $8,8 \times 10^7$, $8,3 \times 10^7$ ir $5,8 \times 10^7$ KfV mL^{-1} . Tai rodo, jog praėjus inkubaciniam laikotarpiui ląstelių adaptacija ir augimas žemesnėje temperatūroje buvo lėtesnis lyginant su aukštesnėmis temperatūromis, o optimali augimo temperatūra siekė $30 \pm 0,5$ °C **(3.13D pav.)**.

Vertinant pH vertės įtaką *Priestia* sp. IIIDEG4 ląstelių augimo efektyvumui pradinė mitybinės terpės pH vertė buvo nustatyta 5 skirtingomis vertėmis su 0,5 skirtumu palaipsniui: 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 ir 8,0. *Priestia* sp. IIIDEG4 ląstelių augimas esant optimizuotai mitybinės terpės sudėčiai ir 30 °C temperatūroje šioje terpėje buvo atitinkamai 0,72, 0,80, 0,85, 0,82 ir 0,75 esant $\text{OT}_{600\text{ nm}}$, atitinkamai ir $4,9 \times 10^7$, $5,8 \times 10^7$, $6,1 \times 10^7$, $5,9 \times 10^7$ ir $4,7 \times 10^7$ KfV mL^{-1} , atitinkamai. Po inkubacinio laikotarpio su pH vertėmis nuo 6,5 iki 7,5 nustatyta, kad ląstelių augimo pokytis svyravo minimaliai, todėl tinkamiausia pH vertė buvo nustatyta $7,0 \pm 0,5$ **(3.13E pav.)**.



3.13 pav. Optimaliausias *Priestia* sp. IIIIEG4 anglies šaltinis mitybinėje terpėje buvo melasa (A); optimaliausias organinis azoto šaltinis mitybinėje terpėje buvo mielių ekstraktas (B); optimaliausias neorganinis azoto šaltinis mitybinėje terpėje buvo $(NH_4)H_2PO_4$ (C). Nustatyta, kad optimaliausia temperatūros reikšmė yra $30 \pm 0,5$ °C (D), o optimali pH vertė buvo palaikoma $7,0 \pm 0,5$ (E). Paklaidų juostos, vidurkis ($n = 4$) $\pm$ standartinis nuokrypis. Skirtingos raidės virš juostų rodo reikšmingus skirtumus ($p < 0,05$) atliekant vienpusę ANOVA.

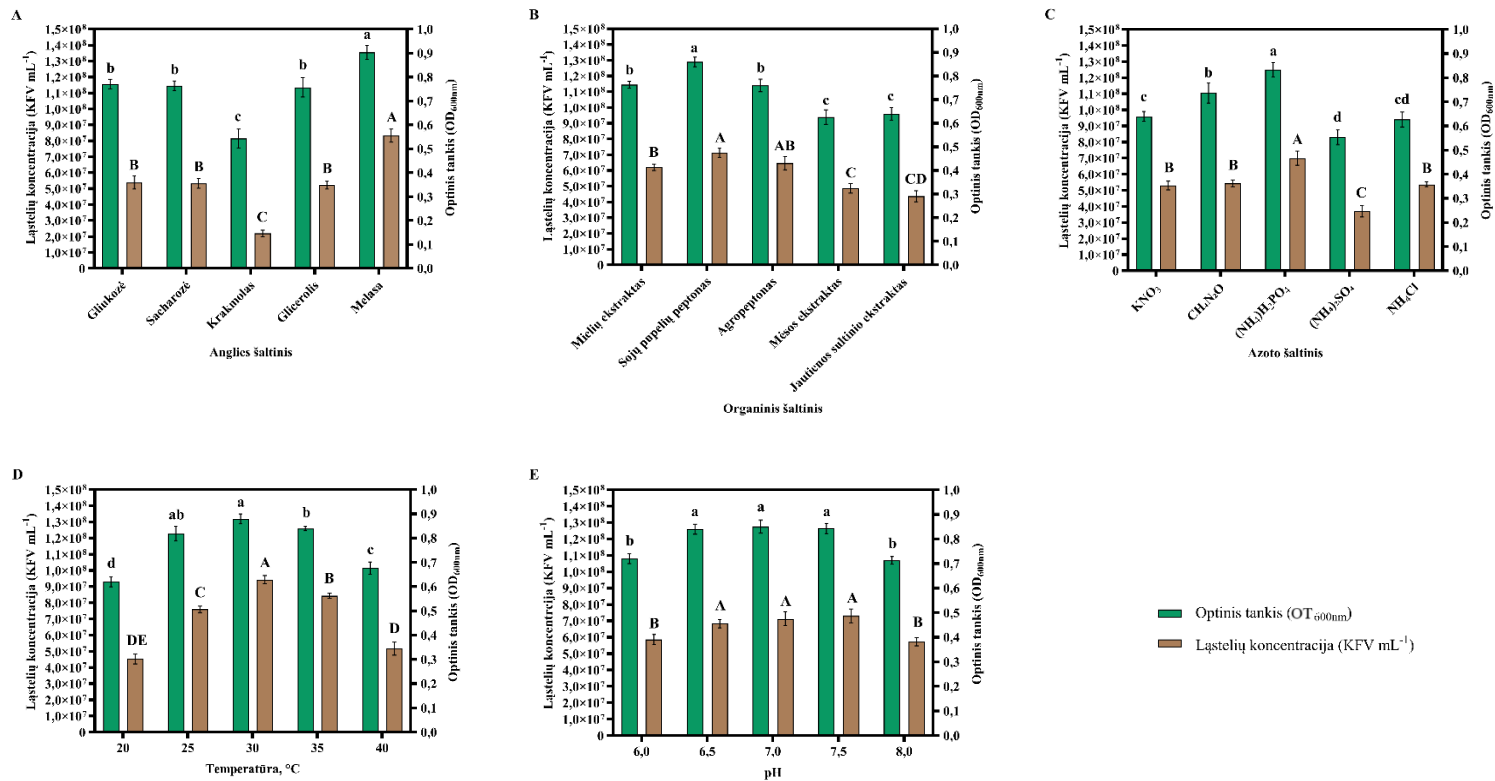
Siekiant nustatyti anglies substratų įtaką *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 + *Priestia* sp. IIIDEG93 sukurtos bendruomenės ląstelių masės prieaugiui po 48 val. bendro kultivavimo metu nustatyta, kad terpėje su gliukoze, sacharoze, krakmolu, gliceroliu ir melasa OT_{600nm} siekė 0,77, 0,76, 0,54, 0,76 ir 0,90, atitinkamai, o KfV mL^{-1} sudarė atitinkamai $5,4 \times 10^7$, $5,3 \times 10^7$, $2,2 \times 10^7$, $5,2 \times 10^7$ ir $8,3 \times 10^7$. Anglies substratinio savitumo tyrimai parodė, kad melasa buvo tinkamiausias substratas mitybinėje *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 + *Priestia* sp. IIIDEG93 (**3.14A pav.**).

Vertinant organinio azoto šaltinio įtaką *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 + *Priestia* sp. IIIDEG93 ląstelių augimui mitybinėje terpėje mielių ekstrakto milteliai, sojų pupelių peptonas, agropeptonas, mėsos ekstrakto milteliai ir jaučio sultinio milteliai sudarė 0,76, 0,86, 0,76, 0,63 ir 0,64 OT_{600nm} , atitinkamai ir $6,2 \times 10^7$, $7,1 \times 10^7$, $6,5 \times 10^7$, $4,9 \times 10^7$ ir $4,4 \times 10^7$ KfV mL^{-1} , atitinkamai. Nustatyta, kad geriausias ląstelių prieaugis gautas kaip organinį azoto šaltinį terpėje naudojant sojų pupelių peptoną (**3.14B pav.**).

Norint įvertinti azoto turinčių substratų įtaką *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 + *Priestia* sp. IIIDEG93 ląstelių dalijimuisi po 48 val. inkubacinio laikotarpio nustatyta, kad KNO_3 , CH_4N_2O , $NH_4H_2PO_4$, $(NH_4)_2SO_4$, NH_4Cl siekė 0,64, 0,74, 0,83, 0,55 ir 0,63 OT_{600nm} , atitinkamai ir $5,3 \times 10^7$, $5,4 \times 10^7$, $7,0 \times 10^7$, $3,7 \times 10^7$ ir $5,4 \times 10^7$ KfV mL^{-1} , atitinkamai. Gauti rezultatai parodė, kad $NH_4H_2PO_4$ buvo tinkamiausias neorganinis azoto turintis substratas mitybinėje terpėje (**3.14C pav.**).

Vertinant temperatūros poveikį *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 + *Priestia* sp. IIIDEG93 ląstelių optimizuotoje mitybinėje terpėje nustatyta, kad prie 20, 25, 30, 35 ir 40 °C temperatūros ląstelių prieaugis buvo atitinkamai 0,62, 0,82, 0,88, 0,84 ir 0,69 esant OT_{600nm} ir $4,5 \times 10^7$, $7,6 \times 10^7$, $9,4 \times 10^7$, $8,4 \times 10^7$ ir $5,2 \times 10^7$ KfV mL^{-1} . Remiantis gautais rezultatais galima daryti prielaidą, jog optimalus ląstelių augimas vyko esant apie $30 \pm 0,5$ °C temperatūrai (**3.14D pav.**).

Paskutiniame etape buvo vertinta pH įtaka *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 + *Priestia* sp. IIIDEG93 ląstelių augimui. Nustatant pradinę mitybinės terpės pH vertę ties 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 ir 8,0 *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 + *Priestia* sp. IIIDEG93 ląstelių augimas esant optimizuotai mitybinės terpės sudėčiai ir $30 \pm 0,5$ °C temperatūrai buvo atitinkamai 0,72, 0,84, 0,85, 0,84 ir 0,71 esant OT_{600nm} ir atitinkamai $5,9 \times 10^7$, $6,8 \times 10^7$, $7,1 \times 10^7$, $7,3 \times 10^7$ ir $5,7 \times 10^7$ KfV mL^{-1} . Po inkubacinio laikotarpio nustatyta, jog pH vertė nuo 6,5 iki 7,5 neturėjo reikšmingo skirtumo *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 + *Priestia* sp. IIIDEG93 ląstelių produkcijai, todėl tinkamiausia pH vertė buvo nustatyta $7,0 \pm 0,5$ intervalu (**3.14E pav.**).



3.14 pav. Optimaliausias *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 + *Priestia* sp. IIIDEG93 anglies šaltinis mitybinėje terpėje buvo melasa (A); optimaliausias organinis azoto šaltinis mitybinėje terpėje buvo sojų pupelių peptonas (B); optimaliausias neorganinis azoto šaltinis mitybinėje terpėje buvo (NH₄)H₂PO₄ (C). Nustatyta, kad optimaliausia temperatūros reikšmė yra 30 ± 0,5 °C (D), o optimali pH vertė buvo palaikoma 7,0 ± 0,5 (E). Paklaidų juostos, vidurkis (n = 4) ± standartinis nuokrypis. Skirtingos raidės virš juostų rodo reikšmingus skirtumus (p < 0,05) atliekant vienpusę ANOVA.

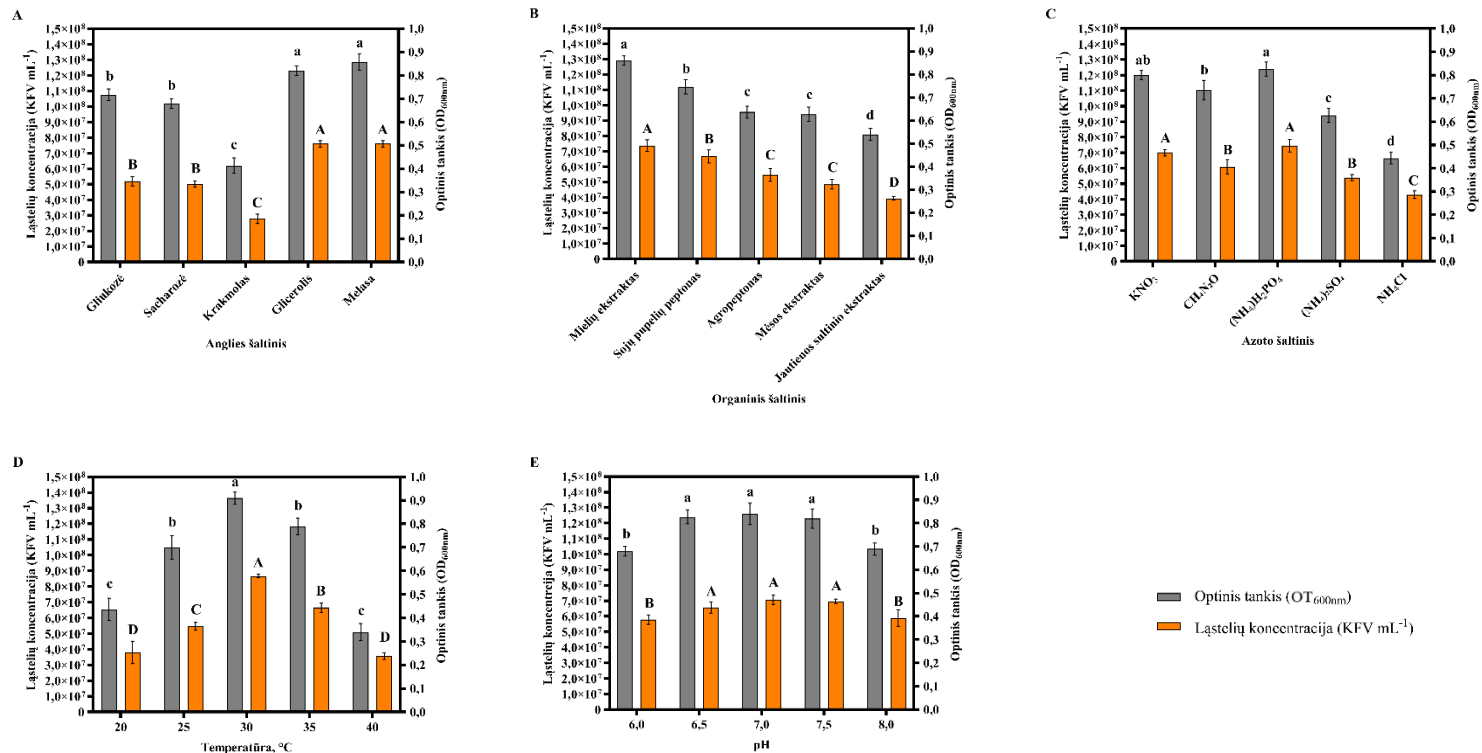
Siekiant nustatyti anglies turinčio substrato įtaką *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91 ir atliekant tyrimą tomis pačiomis sąlygomis nustatyta, kad gliukozės, sacharozės, krakmolo, glicerolio ir melasos OT_{600nm} siekė 0,72, 0,68, 0,41, 0,82 ir 0,86. Atitinkamai, o KfV mL⁻¹ sudarė $5,2 \times 10^7$, $5,0 \times 10^7$, $2,8 \times 10^7$, $7,6 \times 10^7$ ir $7,7 \times 10^7$, atitinkamai. Nors statistiškai reikšmingų skirtumų nepastebėta naudojant glicerolį ir melasą, tačiau pasirinkus melasą mikroskopiškai pastebėtas mažesnis netirpių nuosėdų susidarymas mitybinėje terpėje (**3.15A pav.**).

Įvertinus organinio azoto šaltinio mitybinėje terpėje įtaką *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91 ląstelių augimui nustatyta, jog tinkamiausias organinis substratas kaip ir *Priestia* sp. IIIDEG4 terpėje buvo mielių ekstraktas, kuris sudarė OT_{600nm} 0,86 ir $7,4 \times 10^7$ KfV mL⁻¹. Likę organinės kilmės substratai (sojų pupelių peptonas, agropeptonas, mėsos ekstraktas ir jautienos sultinio ekstraktas) siekė 0,75, 0,64, 0,63 ir 0,54 OT, atitinkamai, o KfV mL⁻¹ sudarė $6,7 \times 10^7$, $5,6 \times 10^7$, $4,9 \times 10^7$ ir $3,9 \times 10^7$, atitinkamai (**3.15B pav.**).

Tiriant neorganinio azoto substrato įtaką *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91 ląstelių koncentracijai nustatyta, kad KNO₃, CH₄N₂O, NH₄H₂PO₄, (NH₄)₂SO₄, NH₄Cl siekė 0,80, 0,74, 0,83, 0,62 ir 0,44 OT_{600nm}, atitinkamai, o KfV mL⁻¹ sudarė $7,0 \times 10^7$, $6,1 \times 10^7$, $7,4 \times 10^7$, $5,4 \times 10^7$ ir $4,3 \times 10^7$, atitinkamai. Iš gautų tyrimo rezultatų nustatyta, jog NH₄H₂PO₄ buvo tinkamiausias azoto šaltinis *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91 ląstelių reprodukcijai (**3.15C pav.**).

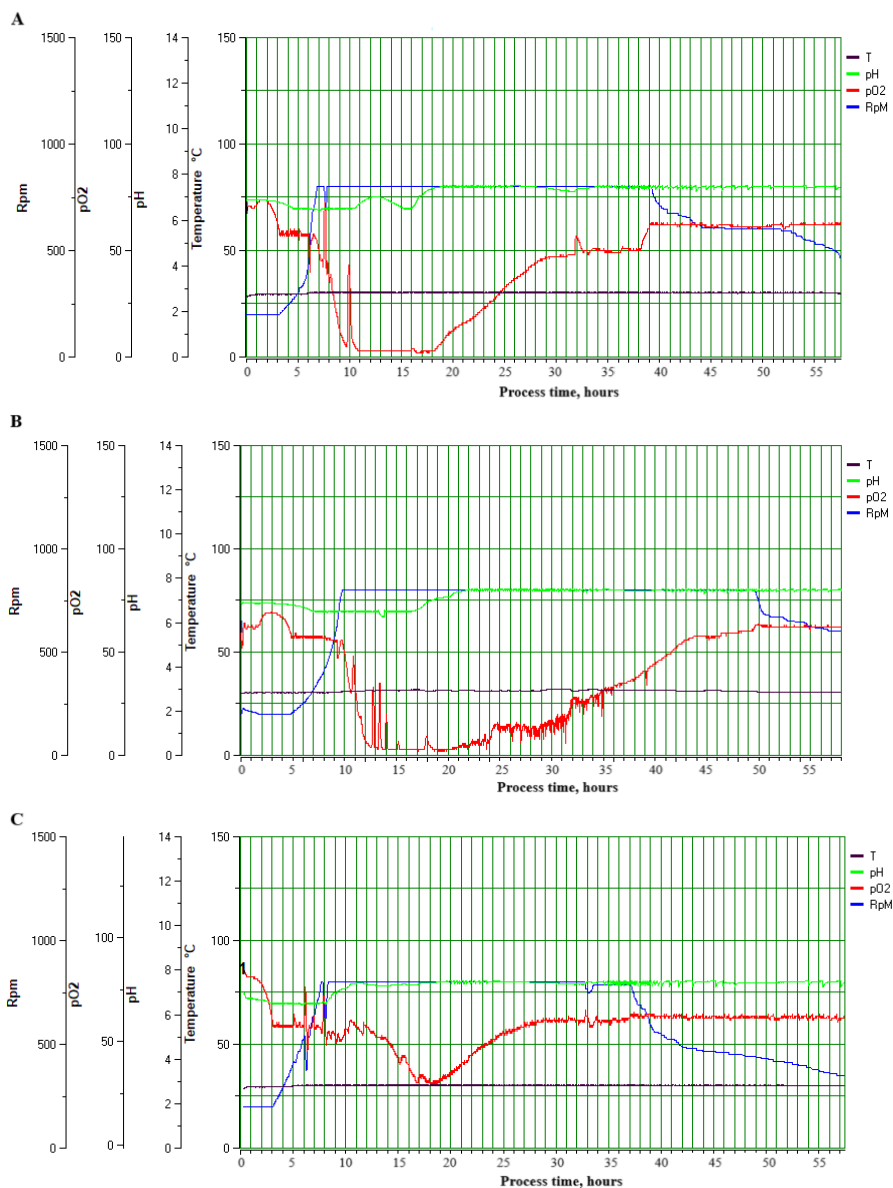
Analizuojant temperatūros įtaką *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91 ląstelių dalijimuisi pastebėta, jog greičiausias ląstelių augimas ir didžiausia ląstelių koncentracija nustatyta ties 30 °C temperatūra, 0,91 OT_{600nm} ir $8,7 \times 10^7$ KfV mL⁻¹. Likusios 20, 25, 35 ir 40 °C temperatūros sudarė 0,44, 0,70, 0,79 ir 0,34 OT_{600nm}, atitinkamai ir $3,8 \times 10^7$, $5,5 \times 10^7$, $6,7 \times 10^7$ ir $3,6 \times 10^7$ KfV mL⁻¹, atitinkamai (**3.15D pav.**).

Reikšmingų skirtumų analizuojant pH įtaką *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91 ląstelių augimui nepastebėta lyginant tiek su *Priestia* sp. IIIDEG4, tiek su *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 + *Priestia* sp. IIIDEG93 variantais. Nustačius terpės pH vertę ties 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 ir 8,0 ląstelių OT_{600nm} atitinkamai siekė 0,68, 0,83, 0,84, 0,82 ir 0,46 ir KfV mL⁻¹ sudarė $5,8 \times 10^7$, $6,6 \times 10^7$, $7,1 \times 10^7$, $7,0 \times 10^7$ ir $5,9 \times 10^7$. Nustatyta, jog pH vertė nuo 6,5 iki 7,5 neturėjo reikšmingo skirtumo *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91 ląstelių dalijimuisi, todėl optimaliausia pH vertė buvo nustatyta $7,0 \pm 0,5$ intervalu (**3.15E pav.**).



3.15 pav. Optimaliausias *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91 anglies šaltinis mitybinėje terpėje buvo melasa (A); optimaliausias organinis azoto šaltinis mitybinėje terpėje buvo sojų pupelių peptonas (B); optimaliausias neorganinis azoto šaltinis mitybinėje terpėje buvo (NH₄)H₂PO₄ (C). Nustatyta, kad optimaliausia temperatūros reikšmė yra 30 ± 0,5 °C (D), o optimali pH vertė buvo palaikoma 7,0 ± 0,5 (E). Paklaidų juostos, vidurkis (n = 4) ± standartinis nuokrypis. Skirtingos raidės virš juostų rodo reikšmingus skirtumus (p < 0,05) atliekant vienkusę ANOVA.

Išaiškinus tinkamiausius *Priestia* sp. IIIDEG4, *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 + *Priestia* sp. IIIDEG93 ir *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91 kamienų maistinės terpės komponentus ir optimalias jų augimo sąlygas tolimesnės analizės buvo atliktos pasitelkiant fermentacijos procesus 5,4 L laboratorinio tūrio bioreaktoriuose (EDF 5.4_1). Fermentacijos proceso pradžioje į bioreaktorių suduotas reikiamas tiriamosios kultūros inokuliatas (inokuliuojamų ląstelių suspensijų koncentracija buvo apie $1,0 \times 10^7$ KfV mL⁻¹). Fermentacijos procesų pradžioje (iki maždaug 3–5 val.) vyko bakterijų biomasės latentinė (*lag*) fazė. Šioje fazėje patekusios į naują aplinką ląstelės prisitaikė prie naujų augimo sąlygų, todėl ląstelių skaičiaus pokytis pirmosiomis fermentacijos valandomis buvo minimalus. Po ląstelių *lag* fazės prasidėjo eksponentinio augimo (*log*) fazė, kurios metu pradėjo vykti intensyvus ląstelių dalijimasis. Šioje fazėje buvo pasiekama didžiausia ląstelių koncentracija fermentacijos produktuose (18–20 fermentacijos valandą: *Priestia* sp. IIIDEG4 $7,9 \times 10^9$ KfV mL⁻¹; *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 + *Priestia* sp. IIIDEG93 $6,5 \times 10^9$ KfV mL⁻¹; o *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91 $7,7 \times 10^9$ KfV mL⁻¹). *Log* fazei pakitus į stacionarią ląstelių augimo fazę ir gliukozės koncentracijai bakterijų suspensijoje pasiekus minimalią koncentraciją (nuo 200 g L⁻¹ ir mažiau), į bioreaktorių vidų aseptinėmis sąlygomis buvo dozuojamas papildomas ląstelių maistinių medžiagų tirpalas (nuo maždaug 20 fermentacijos proceso valandos kiekvienoje fermentacijoje). Ląstelių pamaitinimo procesas buvo atliekamas dozuojuant tirpalą pastoviu 8–10 mL min⁻¹ greičiu ir baigtas tarp 35 ir 40 fermentacijos valandos. Nuo 35–40 fermentacijos valandos pastebėtas laipsniškas ląstelių koncentracijos sumažėjimas fermentacijos mėginiuose. Pagal fermentacijos proceso grafikuose matomus pokyčius, ypačiai mažėjantį maišyklės apsisukimų skaičių per minutę ir paduodamo oro srautą į bioreaktoriaus vidų, pastebėta ląstelių žūties fazės pradžia. Intensyviausia ląstelių žūties fazė kiekviename fermentacijos procese prasidėjo apie 50 fermentacijos proceso valandą (*Priestia* sp. IIIDEG4 ląstelės pradėjo formuoti sporas; *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 + *Priestia* sp. IIIDEG93 pastebėtas abiejų kamienų sporų susidarymas; *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91 pastebėtas *Bacillus* sp. IJAK27 ir *Streptomyces* sp. IJAK91 kamienų sporų formavimasis ląstelėse ir *Pseudomonas* sp. IJAK44 kamieno ląstelių koncentracijos mažėjimas). Fermentacijos procesai laboratorinio tūrio bioreaktoriuje buvo sustabdyti apie 58–60 fermentacijos valandą remiantis bioproceso metu sudaryto realaus laiko fermentacijos proceso grafikai bei atlikus mikroskopinę ląstelių analizę (3.16 pav.).



3.16 pav. Fermentacijų, atliktų 5,4 L laboratorinio tūrio bioreaktoriuose (EDF 5.4_1), procesų grafikai: *Priestia* sp. IIIDE4 (A), *Paenibacillus* sp. IIIDE36 + *Priestia* sp. IIIDE93 (B) ir *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91 (C) (temperature – temperatūra; RPM (*stirrer revolutions per minute*) – maišyklės apsisukimų skaičius per minutę; process time, hours – proceso laikas, val.; pO₂ (*oxygen partial pressure*) – dalinis deguonies slėgis).

Galutiniuose fermentacijos mėginiuose, naudojant LC-TOF/MS, nustatyti pagrindiniai augalų hormonai: auksinų grupės – indol-3-acto rūgštis; citokininų grupės – zeatinas; giberelinų grupės – giberelino rūgštis (GA3) ir

abscizo rūgštis. Trijų *SynComs*, *Priestia* sp. IIIDEG4, *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 + *Priestia* sp. IIIDEG93 ir *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91, sudarytų iš atrinktų bakterijų ląstelių supernatantuose buvo aptikti keturi skirtingi augalų hormonai, įskaitant indol-3-acto rūgštį, zeatiną, giberelino rūgštį ir abscizo rūgštį (3.6 lentelė). Tiriant svarbiausio auksinų klasės fitohormono koncentraciją nustatyta, jog didžiausia indol-3-acto rūgšties koncentracija nustatyta *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91 ląstelių supernatante ($6,60 \mu\text{g mL}^{-1}$), o *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 + *Priestia* sp. IIIDEG93 ir *Priestia* sp. IIIDEG4 nustatyta $2,18 \mu\text{g mL}^{-1}$ ir $1,37 \mu\text{g mL}^{-1}$ koncentracija, atitinkamai.

3.6 lentelė. Fitohormonų analizė trijuose skirtinguose supernatantuose naudojant LC-TOF/MS.

Mėginio pavadinimas	Indol-3-acto rūgštis	Zeatinas	Giberelino rūgštis (GA3)	Abscizo rūgštis
	Koncentracija, $\mu\text{g mL}^{-1}$			
<i>Priestia</i> sp. IIIDEG4	1,37±0,02c	0,22±0,07a	0,80±0,06c	0,03±0,01c
<i>Paenibacillus</i> sp. IIIDEG36 + <i>Priestia</i> sp. IIIDEG93	2,18±0,22b	0,19±0,01b	0,28±0,03b	0,07±0,02b
<i>Bacillus</i> sp. IJAK27 + <i>Pseudomonas</i> sp. IJAK44 + <i>Streptomyces</i> sp. IJAK91	6,60±0,50a	0,15±0,02c	3,40±0,40a	0,25±0,02a

Duomenys pateikti kaip vidurkis ($n = 6$) ± standartinis nuokrypis. Skirtingos raidės rodo reikšmingus skirtumus ($p < 0,05$) vienkryptė ANOVA.

Vieno iš svarbiausių adenino tipo citokininų, zeatino, koncentracija mėginiuose svyravo nuo $0,15$ iki $0,22 \mu\text{g mL}^{-1}$. Didžiausia koncentracija nustatyta *Priestia* sp. IIIDEG4 mėginyje ($0,22 \mu\text{g mL}^{-1}$). Tuo tarpu *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 + *Priestia* sp. IIIDEG93 supernatanto mėginyje nustatyta $0,19 \mu\text{g mL}^{-1}$, o *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91 supernatanto mėginyje $0,15 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Giberelino rūgštis (GA3) yra vienas iš pagrindinių hormonų giberelinų grupėje. Didžiausia GA3 koncentracija aptikta *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91 ląstelių supernatante ($3,40 \mu\text{g mL}^{-1}$), o likusiuose dvejuose mėginiuose, *Priestia* sp. IIIDEG4 ir *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 + *Priestia* sp. IIIDEG93, ženkliai mažesnėmis koncentracijomis ($0,80 \mu\text{g mL}^{-1}$ ir $0,28 \mu\text{g mL}^{-1}$, atitinkamai).

Augalų hormonas, abscizo rūgštis (ABA), atsakingas už augalų apsaugą nuo abiotinių stresų, o didžiausia jo koncentracija aptikta *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91 ląstelių supernatante

(0,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Kitų dviejų mėginių, *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 + *Priestia* sp. IIIDEG93 ir *Priestia* sp. IIIDE4, absčio rūgšties koncentracijos buvo žymiai mažesnės (0,07 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ir 0,03 $\mu\text{g mL}^{-1}$, atitinkamai) (**3.6 lentelė**).

3.6. Mikroorganizmų inokuliacijos poveikis *Z. mays*, *P. vulgaris* ir *T. aestivum* augalų kultūroms

Tyrimuose su augalais *Priestia* sp. IIIDE4, *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 + *Priestia* sp. IIIDEG93 ir *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91 buvo inokuliuoti į visų trijų augalų kultūrų vazonus: *Z. mays*, *P. vulgaris* ir *T. aestivum*. Po augalų kultivavimo nustatyta, jog inokuliacija mikroorganizmais daugeliu atvejų padidino augimo indeksus, palyginti su kontroliniais mėginiais CON1 (mėginys be mikroorganizmų inokuliacijos ir mineralinių P trąšų) ir CON2 (mėginys be mikroorganizmų inokuliacijos ir su superfosfato trąšomis (NPK 0-19-0) 200–300 Kg ha⁻¹ pagal gamintojo nurodytą normą).

Bandymų rezultatai parodė, jog *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 + *Priestia* sp. IIIDEG93, *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91 ir *Priestia* sp. IIIDE4 neturėjo reikšmingų skirtumų tarpusavyje ties *Z. mays* augalo aukščiu (49,85 cm, 49,69 cm ir 49,58 cm, atitinkamai), tačiau turėjo reikšmingus skirtumus lyginant su abiem kontroliniais mėginiais: CON2 – 42,95 cm ir CON1 – 41,98 cm. Analizuojant šaknies ilgį geriausią rezultatą parodė tyrimo variantas *Priestia* sp. IIIDE4 (38,80 cm), tarp bandymų *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 + *Priestia* sp. IIIDEG93, *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91 nenustatyta reikšmingų skirtumų (37,30 cm ir 37,13 cm, atitinkamai), o CON2 ir CON1 variantai turėjo trumpiausius šaknies ilgius (32,22 cm ir 30,13 cm, atitinkamai). Didžiausi viršžeminės dalies žaliosios masės (15,01 g) ir šaknų žaliosios masės (15,92 g) rezultatai gauti su *Priestia* sp. IIIDE4. Reikšmingų skirtumų ties viršžeminės dalies žalia mase nepastebėta tarp *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 + *Priestia* sp. IIIDEG93 (14,18 g) ir *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91 (14,02 g) variantų, tačiau aptikta ties žalia šaknų mase (14,58 g *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 + *Priestia* sp. IIIDEG93 ir 15,90 g *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91). Viršžeminės dalies žaliąją masę CON2 ir CON1 variantuose parodė mažiausius rezultatus be reikšmingų skirtumų tarpusavyje (10,85 g ir 10,68 g, atitinkamai), o ties šaknų žalia mase abu tyrimo variantai turėjo tą pačią vertę (11,50 g). Viršžeminės dalies sausos masės tyrime didžiausias masė nustatytas variante *Priestia* sp. IIIDE4 (1,18 g), toliau variantuose *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 +

Streptomyces sp. IJAK91 (1,13 g), *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 + *Priestia* sp. IIIDEG93 (1,08 g), CON2 (0,82 g) ir CO1 (0,80 g). Ties sausa šaknų mase didžiausią rezultatą davė variantas *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91 (1,48 g), tada variantai *Priestia* sp. IIIDE4 (1,37 g), *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 + *Priestia* sp. IIIDEG93 (1,28 g), CON2 (1,11 g) ir CON1 (0,95 g).

Tyrimai su *P. vulgaris* viršeminės dalies ilgiu neparodė reikšmingų skirtumų tarp visų testuotų variantų: *Priestia* sp. IIIDE4 (64,17 cm), *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91 (63,50 cm), *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 + *Priestia* sp. IIIDEG93 (63,17 cm), CON2 (53,00 cm) ir CON1 (52,17 cm). Nustatant šaknies ilgį *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 + *Priestia* sp. IIIDEG93 bandymo variantas parodė geriausius rezultatus (51,83 cm), tuo tarpu tarp bandymo variantų *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91, *Priestia* sp. IIIDE4 ir CON2 nenustatyta reikšmingų skirtumų (49,50 cm, 47,67 cm ir 39,33 cm), o CON1 parodė prasčiausius rezultatus (36,00 cm). Reikšmingų skirtumų nenustatyta ir tarp visų variantų atlikus analizę su viršžeminės dalies žalia mase ir gauti rezultatai svyravo nuo 4,23 iki 5,45 g. Analizuojant šaknų žalią masę nustatyta, kad bandymo variantai *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 + *Priestia* sp. IIIDEG93 ir *Priestia* sp. IIIDE4 turėjo geriausius rezultatus (10,28 ir 9,60 g, atitinkamai). Reikšmingų skirtumų neaptikta tarp variantų *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91 ir CON2 (9,08 g ir 8,07 g, atitinkamai), CON1 variante nustatytas masė siekė tik 7,22 g. Atlikus vertinimus su viršžeminės dalies sausa mase nustatyta, jog *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91 davė geriausius rezultatus (0,50 g), o reikšmingų skirtumų nenustatyta tarp *Priestia* sp. IIIDE4 ir *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 + *Priestia* sp. IIIDEG93 (po 0,47 g). CON2 ir CON1 variantai viršžeminės dalies sausos masės rezultatuose parodė 0,42 ir 0,40 g, rezultatus, atitinkamai. Matuojant šaknų sausą masę nustatyta, kad variantai *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91 ir *Priestia* sp. IIIDE4 parodė geriausius rezultatus (0,86 ir 0,84 g), toliau sekė *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 + *Priestia* sp. IIIDEG93 (0,79 g), o variantai CON2 ir CON1 neturėjo reikšmingo skirtumo tarpusavyje (0,72 ir 0,71 g, atitinkamai) (3.7 lentelė).

3.7 lentelė. *Z. mays*, *P. vulgaris* ir *T. aestivum* augalų kultūrų augimo indeksų rezultatai augalus paveikus *Priestia* sp. IIIDE4, *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 + *Priestia* sp. IIIDEG93 arba *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91 bandymo variantais.

Augimo indeksai	Bandymo pavadinimas				
	CON1 [†]	CON2 [‡]	<i>Priestia</i> sp. IIIDE4	<i>Paenibacillus</i> sp. IIIDEG36 + <i>Priestia</i> sp. IIIDEG93	<i>Bacillus</i> sp. IJAK27 + <i>Pseudomonas</i> sp. IJAK44 + <i>Streptomyces</i> sp. IJAK91
<i>Z. mays</i>					
Augalo ilgis (cm)	41,98 b	42,95 b	49,58 a	49,85 a	49,68 a
Šaknies ilgis (cm)	30,13 c	32,22 bc	38,80 a	37,30 ab	37,13 ab
Viršžeminės dalies žalia masė (g)	10,68 b	10,85 b	15,01 a	14,18 ab	14,02 ab
Šaknies žalia masė (g)	11,50 b	11,50 b	15,92 a	14,58 ab	15,90 a
Viršžeminės dalies sausa masė (g)	0,80 c	0,82 bc	1,18 a	1,08 ab	1,13 a
Šaknies sausa masė (g)	0,95 b	1,11 ab	1,37 ab	1,28 ab	1,48 a
<i>P. vulgaris</i>					
Augalo ilgis (cm)	52,17 a	53,00 a	64,17 a	63,17 a	63,50 a
Šaknies ilgis (cm)	36,00 b	39,33 ab	47,67 ab	51,83 a	49,50 ab
Viršžeminės dalies žalia masė (g)	4,23 a	4,43 a	5,18 a	5,38 a	5,45 a
Šaknies žalia masė (g)	7,22 b	8,07 ab	9,60 a	10,28 a	9,08 ab
Viršžeminės dalies sausa masė (g)	0,40 c	0,42 bc	0,47 ab	0,47 ab	0,50 a
Šaknies sausa masė (g)	0,71 b	0,72 b	0,84 a	0,79 ab	0,86 a
<i>T. aestivum</i>					
Augalo ilgis (cm)	51,67 b	55,83 ab	62,33 ab	60,33 ab	63,50 a
Šaknies ilgis (cm)	25,83 c	27,33 bc	33,33 ab	28,50 bc	36,00 a
Viršžeminės dalies žalia masė (g)	6,15 b	6,92 ab	9,53 a	7,68 ab	9,60 a
Šaknies žalia masė (g)	7,05 b	8,68 ab	10,32 a	8,85 ab	10,93 a
Viršžeminės dalies sausa masė (g)	0,53 c	0,57 b	0,88 a	0,70 ab	0,87 a
Šaknies sausa masė (g)	0,54 c	0,72 b	0,84 ab	0,78 b	0,97 a

[†]CON1: neinokuliuotas bandymas. [‡]CON2: neinokuliuotas bandymas su superfosfatu (NPK 0-19-0).

Duomenys pateikti kaip vidurkis (n = 6) ± standartinis nuokrypis. Skirtingos raidės rodo reikšmingus skirtumus (p < 0,05) naudojant vienkryptę ANOVA.

Atliekant analizes su *T. aestivum* augalų kultūra bendras *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91 inokuliacija parodė didžiausius šaknų ilgius (36,00 cm) ir augalų aukščius (63,50 cm), palyginti su *Priestia* sp. IIIDE4 šaknų ilgiu (33,33 cm) ir augalų aukščiu (62,33 cm) bei *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 + *Priestia* sp. IIIDEG93 šaknų ilgiu (28,50 cm) ir augalų aukščiu (60,33 cm). Tačiau taikant inokuliaciją su *Priestia* sp. IIIDE4 ar su *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 + *Priestia* sp. IIIDEG93 gauti statistiškai reikšmingesni rezultatai palyginti su CON2 variantu (27,33 cm šaknies ilgiu ir 55,83 cm augalų aukščiu) ir CON1 variantu (25,83 cm šaknies ilgiu ir 51,67 cm augalų aukščiu). Buvo iškelta hipotezė, kad sinergiškai veikiantys AASM gali skirtis savo gebėjimu padidinti augimo indeksus, kai jie inokuliuojami kartu ir tai rodo didesnę atsaką nei tręšiant tik mineralinėmis trąšomis ar nenaudojant jokios tręšimo technologijos. *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91 ir *Priestia* sp. IIIDE4 viršžeminės dalies žalioji masė buvo didesnė, palyginti su kitais bandymo variantais (9,60 g ir 9,53 g, atitinkamai). Geriausi rezultatai gauti ir tiriant šaknų žalią masę naudojant *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91 ir *Priestia* sp. IIIDE4 (10,93 g ir 10,32 g, atitinkamai). Prasčiausiai iš trijų inokuliacijos variantų mikroorganizmais pasirodė *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 + *Priestia* sp. IIIDEG93 (7,68 g viršžeminės dalies žalia masė; 8,85 šaknies žalia masė) neturėjęs reikšmingų skirtumų su CON2 variantu (6,92 g viršžeminės dalies žalia masė; 8,68 g šaknies žalia masė), o CON1 variantas parodė prasčiausius rezultatus (6,15 g viršžeminės dalies žalia masė; 7,05 g šaknies žalia masė). *Priestia* sp. IIIDE4 ir *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91 inokuliacija turėjo geresnius rezultatus analizuojant viršžeminės dalies sausą masę (0,88 g ir 0,87 g, atitinkamai). *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 + *Priestia* sp. IIIDEG93 variante sausa viršžeminės dalies masė siekė 0,70 g. Prasčiausi rezultatai nustatyti bandymo variantuose CON2 ir CON1 (0,57 g ir 0,53 g, atitinkamai). Analizuojant šaknies sausą masę geriausią rezultatą parodė inokuliacija su *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91 (0,97 g), po jo bandymo variantas *Priestia* sp. IIIDE4 (0,84 g). Reikšmingų skirtumų nepastebėta tarp varianto *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 + *Priestia* sp. IIIDEG93 (0,78 g) ir CON2 (0,72 g). Mažiausia sausa šaknies masė nustatyta variante CON1 (0,54 g) (**3.7 lentelė**).

Apibendrinant galima daryti išvadą, jog augalų kultūrų inokuliacija su mikrobiologiniais preparatais visais atvejais parodė geresnius fiziologinius augalų augimo rezultatus lyginant juos su kontroliniais variantais. Pagal gautus tyrimo rezultatus iškelta hipotezė, jog inokuliacija su vienos rūšies

izoliatu *Priestia* sp. IIIDE4 parodė geriausius *Z. mays* vegetacijos rezultatus (5 iš 6 augimo indeksų), o būtent šio mikroorganizmo izoliacija buvo atlikta 2020 m. iš *Z. mays* rizosferos dirvožemio mėginio. Tyrime su *P. vulgaris* augalų kultūra nustatyta, jog visi trys bandymo variantai *Priestia* sp. IIIDE4, *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 + *Priestia* sp. IIIDEG93 ir *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91 parodė panašius rezultatus (4 iš 6 augimo indeksų). Nors *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 + *Priestia* sp. IIIDEG93 buvo išskirta iš 2021 m. *P. vulgaris* rizosferos dirvožemio mėginio ir atrinktas kaip geriausias dvigubas skirtingų mikroorganizmų mišinys, tačiau fiziologiniams augalų augimo rezultatams reikšmingų skirtumų neparodė. Atlikus analizę su *T. aestivum* augalų kultūra nustatyta, jog tyrimo variantas *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91 vienareikšmiškai parodė geriausius rezultatus (6 iš 6 augimo indeksų) lyginant su kitais bandymo variantais. Iškelta hipotezė, jog trijų skirtingų izoliatų inokuliacija *T. aestivum* augalams buvo tinkamiausia priemonė paskatinti augalų vegetaciją ir būtent šis mikroorganizmų mišinys buvo izoliuotas iš *T. aestivum* rizosferos dirvožemio mėginio 2022 m.

Siekiant pritaikyti šių mikroorganizmų mišinių panaudojimą žemės ūkio augalų kultūroms ir šiuos mikroorganizmus pritaikyti pramoninei gamybai, reikalingi išsamesni eksperimentiniai tyrimai ir sumodeliuotų produktų panaudojimas žemės ūkio paskirties žemėse realiomis lauko sąlygomis. Keičiantis klimatui būtina užtikrinti tinkamą mikroorganizmų pritaikomumą. Analizės realiomis aplinkos sąlygomis turi būti atliktos bent kelerius metus iš eilės naudojant įvairių vietovių žemės ūkio paskirties laukus, įvairias kultivuojamų augalų kultūras ir suplanuojant detalesnius tyrimus. Šiam tikslui yra reikalingi žemės ūkio, mokslo ir verslo partneriai, kurie užsiima ekologinėmis ir pramoninės biotechnologijos sritimis.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

Augalų mikrobiomas suformuojamas ir įdarbinamas per visą augalo-šeimininko gyvavimo ciklą. Su šaknimis susijusio mikrobiomo sudėtį sudaro sudėtingos daugiašalės abiotinės aplinkos veiksmų ir biotinių gyventojų sąveikos [209]. Keletas tyrimų parodė, kad bakterijų bendruomenės rizosferoje dinamiškai formuoja aplinkos veiksniai, tokie kaip sezonas, dirvožemio tipas, dirvožemio tręšimo istorija, maistinių medžiagų ir vandens kiekis, taip pat augalo-šeimininko rūšis ir vystymosi stadija. Mikroorganizmų įvairovė mažėja nuo biraus dirvožemio keliaujant link šaknų paviršiaus, t. y. rizosferos zonos, o tai rodo palankias sąlygas reikiamoms mikroorganizmų rūšims kolonizuoti augalų šaknis [210]. Augalai per šaknis išskiria apie 10–40 % daugelio maistinių medžiagų, ypač fiksuotos anglies, kuri gali patekti per šaknis į rizosferą, todėl augalas aktyviai dalyvauja formuodamas savo pagrindinį mikrobiomą. Mikrobiomų rinkinys susidaro per kelis etapus, kuriuos lemia mikroorganizmo-mikroorganizmo ir augalo-mikroorganizmo sąveikos [211]. Augalų mikrobiomas paprastai perduodamas horizontaliu keliu (t.y. suformuojama iš aplinkos) arba vertikaliu keliu (t. y. pernešama per sėklas), nors išsami informacija apie horizontalius ir vertikalius perdavimo būdus vis dar menkai suprantama [212]. Kai kurios mikroorganizmų gentys, tokios kaip *Bacillus* ar *Pseudomonas*, priklauso pagrindinei mikrobiotai ir nuolat išlaiko gana didelę gausą augalų vegetacijos metu. Ši pagrindinė mikrobiota turi keletą naudingų savybių, tokių kaip didesnis atsparumas stresui, teigiamas poveikis augalo augimui, efektyvi kolonizacija ir augalų apsauga nuo atšiaurių aplinkos poveikių [213].

Atsižvelgiant į šių dienų neigiamas tendencijas žemės ūkio pramonėje, tokios inovacijos tampa itin aktualios dėl aplinkosauginių ir ekonominių priežasčių. Mikrobiologiniai preparatai padeda atkurti natūralų dirvožemio gyvybingumą, išvengti perteklinio cheminių trąšų bei pesticidų naudojimo ir auginti ekologišką produkciją. Nors mineralinės bei cheminės trąšos vis dar plačiai taikomos žemės ūkio pramonėje, tačiau vis daugiau kalbama apie jų neigiamą poveikį aplinkai ir gyviems organizmams. AASM pritaikymas žemės ūkyje vis dar išlieka viena pagrindinių priemonių kurti augalų augimą skatinančiomis savybėmis pasižyminčius biologinius preparatus. Nors daugelio mikroorganizmų pritaikymas žemės ūkio sektoriuje įvairioms augalų rūšims vis dar išlieka problematiškas ir iki galo gerai nesuprastas, tačiau literatūroje gausu informacijos, kurioje aprašoma, jog AASM yra parodę nemenką potencialą augalų vegetacijos procesuose ir dirvožemio degradacijos mažinime. Tačiau tiek mikroorganizmų izoliacijos ir atrankos, tiek jų metabolitų susidarymo ir pritaikymo žemės ūkiui procesai turi būti toliau

optimizuojami ir efektyvinami. Mikroorganizmų kaip mikrobiologinės trąšos pritaikomumas yra atliekamas jau žinant gerai aprašytas strategijas bei metodus, o taip pat ir pasitelkiant plačiausiai ištirtus mikroorganizmus. Tačiau būtina ieškoti naujų, netirtų arba menkai ištirtų mikroorganizmų [214].

Dirvožemio bakterijų bendruomenės yra labai svarbios žemės ūkio sistemų sudedamosios dalys, nes jos prisideda prie augalų sveikatos ir produktyvumo per anglies ir maistinių medžiagų ciklus, pesticidų skaidymą, patogenų slopinimą ir augalų augimo skatinimą. Neseniai naujausi tyrimai, kuriuos įgalino didelio našumo DNR sekos nustatymas, sukėlė revoliuciją mikroorganizmų įvairovės tyrimuose. Manoma, kad dirvožemio fizinės ir cheminės savybės, pavyzdžiui, pH, C_{org} , drėgmė ir temperatūra, sukuria stiprius aplinkos filtrus mikroorganizmų bendruomenių susidaryme, kontroliuoja mikroorganizmų aktyvumą ir yra pagrindiniai dirvožemio bendruomenės sudėties veiksniai. Mokslinių straipsnių duomenų bazėse nuolat atsiranda naujos informacijos apie iki šiol neaprašytų skirtingų mikroorganizmų ar mikroorganizmų mišinių poveikį ir pritaikomumą įvairioms žemės ūkio augalų kultūroms [215]. Šiame darbe buvo siekiama identifikuoti, charakterizuoti ir pritaikyti skirtingų mikroorganizmų ar jų mišinių pritaikomumą trims žemės ūkio augalų kultūroms: *Z. mays*, *P. vulgaris* ir *T. aestivum*. Sintetinių mikroorganizmų bendruomenių sukūrimas ir pritaikymo potencialas žemės ūkio panaudojime yra vienas svarbiausių šios disertacijos uždavinių.

Tikslinių mikroorganizmų izoliavimas, atranka, identifikavimas bei filogenetinė analizė ir *Z. mays*, *P. vulgaris* ir *T. aestivum* rizosferos dirvožemio mėginių mikrobiomo santykinio gausumo tyrimai buvo vieni iš pirmųjų ir svarbiausių eksperimentinio darbo etapų, kuriems buvo skiriamas didžiausias dėmesys. Šio etapo metu iš trijų skirtingų žemės ūkio paskirties dirvožemių (JAK, BEI ir DEG), kuriuose buvo pritaikyta ta pati sėjomainos ir žemės apdirbimo technologija, iš viso izoliuoti ir atrinkti 27 skirtingi mikroorganizmai (po 9 izoliatų kiekvienais iš eilės einančiais tyrimo metais), galintys turėti augalų augimą skatinančių savybių. Pirminė izoliatų atranka buvo paremta principu, kad mikroorganizmų mišiniai turi būti sudaryti iš trijų skirtingų mikroorganizmų genčių ir kad atrinktos trys mikroorganizmų gentys priklausytų bent jau dviem, o idealiomis sąlygomis ir trims skirtingiems bakterijų karalystės tipams. Analizuojant mokslinę literatūrą rasta nemažai informacijos, jog daugumoje žemės ūkio paskirties laukų ir juose auginamų skirtingų augalų kultūrų šaknų rizosferoje labiausiai dominuoja 3 pagrindiniai bakterijų tipai: *Pseudomonadota*, *Bacillota* ir *Actinomycetota* [216, 217]. Nors, remiantis literatūros analize, kaip labiausiai dominuojantis tipas augalų šaknų rizosferoje nustatytas *Pseudomonadota*, tačiau mūsų tyrime pastebėta, jog visuose trijuose žemės ūkio paskirties rizosferos dirvožemiuose labiausiai

dominuojantis tipas buvo *Actinomycetota*, tik tada po jo pagal gausumą sekė *Pseudomonadota* ir *Bacillota* tipai. Literatūroje nurodoma, jog *Pseudomonadota* tipas linkęs dominuoti rizosferoje dėl šaknų eksudatų išskyrimo, kuris skatina greitą mikroorganizmų dauginimąsi, tuo tarpu *Actinomycetota* tipas dažniau dominuoja birame dirvožemyje, nes jų dauginimuisi šaknų eksudatai neturi tiesioginės įtakos [218]. Tačiau kai kurių specifinių dirvožemių tipų, augalų rūšių ar abiotinių stresų sąlygomis *Actinomycetota* tipas gali nukonkuruoti *Pseudomonadota* tipą ir tapti gausesnis. Mikroorganizmų, priklausančių *Actinomycetota* tipui, didžiausias gausumas aptinkamas sausuose, šarminiuose, smėlinguose bei mažą organinių medžiagų kiekį turinčiuose dirvožemiuose. *Actinomycetota* gausumas didesnis kuomet augalus veikia atšiaurios aplinkos sąlygos, nes šiam tipui priklausantys mikroorganizmai geba skaidyti sudėtingesnės struktūros organines medžiagas ir egzistuoti nepriklausomai nuo augalo-šeimininko [219]. *Actinomycetota* tipas labiausiai išsiskiria *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Frankia*, *Nocardoides* ir *Arthrobacter* gentimis [220]. *Pseudomonadota* tipas yra priskiriamas prie labiausiai dominuojančių tipų, kuriam priklauso *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Enterobacter* ir *Bradyrhizobium* gentys [221]. *Bacillota* tipe labiausiai dominuojanti ir geriausiai ištirta bakterijų gentis yra *Bacillus*, bet taip pat pagal gausumą dominuoja ir *Paenibacillus*, *Clostridium*, *Lysinibacillus*, *Exiguobacterium* ir *Sporosarcina* gentys [222].

Pirmaisiais tyrimų metais (2020 m.) iš *Z. mays* šaknų rizosferos zonos išskirtos trys skirtingos gentys *Bacillus*, *Pseudomonas* ir *Rhodococcus* bei nustatyta, jog šios trys gentys priklausė trimis skirtingiems bakterijų karalystės tipams: *Bacillota*, *Pseudomonadota* ir *Actinomycetota*, atitinkamai (**3.6A–C pav.**). Pastebėta, jog izoliacijos ir atrankos metu didžiausią augimo greitį turėjo *Pseudomonas* gentis dėl savo labai didelio metabolinio aktyvumo net ir naudojant skirtingus mitybinius substratus (12–24 val.), *Bacillus* gentis pasižymėjo lėtesniu nei *Pseudomonas*, tačiau vis tiek greitu augimo tempu (18–24 val.), o pagrindinė savybė, kuria pasižymi *Bacillus* gentis yra sporų formavimas ir puikus prisitaikymas prie įvairių aplinkos sąlygų. Lėčiausias augimo greitis pastebėtas *Rhodococcus* genties izoliatuose (48–72 val.), tačiau nors ir ši gentis auga lėtai, bet geba ilgai išgyventi sunkiomis aplinkos sąlygomis dėl sudėtingos ląstelės sienelės struktūros, kuri suteikia atsparumą, tačiau sumažina maistinių medžiagų ir deguonies pralaidumą, o tai sulėtina ląstelių augimą [223]. Iš *Pseudomonadota* tipo pasirinkta labiausiai šiame tipe dominuojanti *Pseudomonas* gentis, o iš *Bacillota* tipo – labiausiai dominuojanti *Bacillus* gentis. Amogou ir kt. (2021 m.) atlikta analizė parodė, jog inokuliacija su *Pseudomonas syringae* kartu su sumažintomis NPK trąšų

dozėmis pagerino kukurūzų augimą ir derlių nualintose dirvose. Geriausi rezultatai buvo pasiekti naudojant *P. syringae* kartu su 50 % NPK ir karbamidu, kur augalų aukštis, lapų plotas, šaknų žalios masės svo ir derlius padidėjo atitinkamai 26,82, 32,23, 107,57 ir 30,64 %, palyginti su kontroliniu mėginiu [224]. Kitas tyrimas parodė, kad *Pseudomonas* ir *Bacillus* gentys, turinčios fosfato tirpimo gebėjimą, gali pagerinti fosforo pasisavinimą ir skatinti *Z. mays* vegetacijos procesus. Šie mikroorganizmai išskiria organines rūgštis ir fosfatazes, kurios padeda mineralizuoti organinį fosforą dirvožemyje [225]. Nors *Actinomycetota* tipe *Rhodococcus* gentis nėra tarp labiausiai dominuojančių genčių ir literatūroje apie ją rasta mažiausiai informacijos, tačiau aptikta keletas straipsnių, kuriuose šis mikroorganizmas yra priskiriamas prie augalų augimą skatinančių mikroorganizmų *Z. mays* šaknų rizosferoje. Viena tyrimo nustatyta, jog *Rhodococcus* gentis identifikuojama kukurūzų šaknų rizosferoje, o atlikti tyrimai nurodo galimą IAA produkciją ir teigiamą ACC deaminazės aktyvumą, kurie pagerino *Z. mays* šaknų augimą ir atsparumą sausrai atlikus bandymus, kurių metu buvo imituojamos lauko sąlygos [226, 227]. Taip pat pažymėtina, jog *Rhodococcus* genties mikroorganizmai gali būti naudojami mikrobiologinių preparatų mišiniuose kartu su *Bacillus*, *Pseudomonas* arba *Azospirillum* gentimis siekiant sustiprinti jų sinergetinį poveikį [228]. Tačiau tyrimų, kuriuose *Rhodococcus* gentis būtų naudojama kartu su *Bacillus* ir *Pseudomonas* gentimis kaip bakterijų mišinys *Z. mays* vegetacijai skatinti, nebuvo rasta. Todėl pirmojoje tyrimų grupėje izoliuoti ir tolimesniems tyrimams atrinkti izoliatai, dalinio identifikavimo ir kamienų profiliavimo metu parodę artimumą *Bacillus altitudinis* (IJAK92), *Pseudomonas thivervalensis* (IJAK41), *Rhodococcus qingshengii* (IJAK17), *Bacillus licheniformis* (IIBEI11), *Pseudomonas laurylsulfatiphila* (IIBEI19), *Rhodococcus erythropolis* (IIBEI38), *Priestia aryabhatai* (IIIDEG4), *Pseudomonas laurylsulfativorans* (IIIDEG59) ir *Rhodococcus erythropolis* (IIIDEG40) rūšims, ir buvo pasirinkti tolimesniems tyrimams (**3.2A–C pav.**).

Antrosios tyrimo grupės metu (2021 m.) iš *P. vulgaris* šaknų rizosferos išskirtos trys skirtingos gentys *Pararhizobium*, *Paenibacillus* ir *Bacillus* bei nustatyta, jog *Pararhizobium* gentis priklauso *Pseudomonadota* tipui, o *Paenibacillus* ir *Bacillus* – *Bacillota* bakterijų tipui (**3.7A–B pav.**). Nors *Actinomycetota* gausumas buvo didžiausias visuose tirtuose *P. vulgaris* rizosferos mėginiuose, tačiau nepavyko išskirti nei vieno izoliato priklausančio šiam tipui. Tai sutampa su literatūros duomenimis, jog *Actinomycetota* izoliavimas iš dirvožemio dažnai būna sudėtingas dėl lėto augimo tempo (greitai augančios bakterijos ar grybai gali užgožti jų augimą mitybinėje terpėje), reiklumo mitybinės terpės sudėčiai (specialūs anglies

šaltiniai, pavyzdžiui, chitinas ar celiuliozė) ir konkurencijos su vietine mikroflora, nes *Actinomycetota* tipo gentys turi mažesnę konkurencinę galią *in vitro*, nebent terpė selektyviai slopina kitų bakterinių tipų genčių augimą [229]. Nors *Rhizobium* gentis yra taip pat dažnai aptinkama *Pseudomonadota* tipe, tačiau mūsų darbe izoliuoti mikroorganizmai priklausė *Pararhizobium* genčiai. Kitų autorių filogenetiniai tyrimai parodė, kad kai kurios rūšys, anksčiau priskirtos *Rhizobium*, genetiškai pakankamai skiriasi tarpusavyje, todėl *Pararhizobium* buvo atskirta kaip nauja gentis [230]. Literatūros analizė patvirtina, kad *Pararhizobium* yra simbiotinės azotą fiksuojančios bakterijos, kurios turi labai glaudų ryšį su ankštinių augalų (*Fabaceae*) šaknimis. Jos atpažįsta specifinius cheminius signalus (flavonoidus), kuriuos išskiria ankštinių augalų šaknys, o *Pararhizobium* atsako išskirdama *nod* faktorius, kurie sukelia šaknų ląstelių dalijimąsi ir gumbelio susiformavimą. Šaknų gumbeliai sukuria labai mažai deguonies turinčią aplinką, kuri yra būtina fermentui nitrogenazei. Augalas aprūpina bakterijas angliavandeniais, o bakterijos mainais fiksuoja atmosferinį azotą ir paverčia jį augalui prieinamu junginiu (NH_4^+) [231, 232]. Taip pat nustatyta, kad *Pararhizobium giardinii* ne tik sugeba fiksuoti atmosferos azotą, bet ir pasižymi gebėjimu tirpinti netirpius fosforo junginius, be to, išskiria augalų hormoną IAA [233]. *Pararhizobium* genties bakterijos (kaip ir dauguma simbiozinių bakterijų) nėra gerai prisitaikiusios prie ekstremalių aplinkos sąlygų už augalo šeiminingo ribų. Jos yra jautrios sausrai, UV spinduliutei, temperatūros pokyčiams, druskingam ir rūgštiniam dirvožemiui. Kadangi *Pararhizobium* genties bakterijų ląstelės neformuoja sporų ir pati ląstelės sienelės struktūra yra mažiau atspari aplinkos poveikiui, dauguma komercinių produktų naudojamų žemės ūkyje turi ypač trumpą galiojimo laiką [234].

Paprastai *Bacillus* ir *Paenibacillus* yra vienos iš labiausiai paplitusių *Bacillota* bakterijų tipo genčių, naudojamų ekologinėje žemdirbystėje kaip biologinės trąšos. Žinoma, jog šios gentys geba fiksuoti atmosferos azotą, tirpina netirpius fosforo junginius, skatina šaknų augimą ir šaknų plaukelių vystymąsi išskirdamos augalų hormonus, veikia kaip biokontrolės agentai ir slopina augalų patogenus [235, 236]. Buvo atliktas tyrimas, kurio metu *P. vulgaris* sėklos buvo apdorotos *Rhizobium tropici* CIAT 899, *Paenibacillus polymyxa* DSM 36 ir *P. polymyxa* Loutit atskirai ir mišinyje (CIAT 899 + DSM36 + Loutit). Nustatyta, jog sėjant *P. vulgaris* kartu su *Rhizobium* ir abiem *Paenibacillus* kamienais padidėjo augalų augimas, azoto kiekis ir mazgelių susidarymas, palyginti su vienu *Rhizobium* inokuliavimu [237]. Taipogi, tyrimai rodo, kad kombinuota inokuliacija su *Rhizobium* ir *Bacillus* bakterijomis gali būti naudinga, ypač esant ribotam fosforo kiekiui dirvožemyje. Tyrimas buvo atliktas siekiant įvertinti viengubos, dvigubos ir

trigubos inokuliacijos su *Rhizobium*, azotą fiksuojančiu *Bacillus subtilis* OSU-142 ir fosforą tirpinančiu *Bacillus megaterium* M-3 poveikį pupų gumbelių formavimuisi, augimui, maisto medžiagų pasisavinimui ir sėklų derliui. Atlikus bakterijų inokuliacija reikšmingai padidėjo visi tiriamieji parametrai, lyginant juos su kontroliniu variantu. Triguba inokuliacija (*Rhizobium*+OSU-142+M-3) padidino sėklų derlių nuo 6,6 % (triguba inokuliacija) iki 12,2 % (vienguba inokuliacija su OSU-142) palyginti su kontroliniu variantu [238]. Informacijos apie *Pararhizobium*, *Paenibacillus* ir *Bacillus* trigubos inokuliacijos poveikį *P. vulgaris* augimui neaptikta, todėl tolimesniems tyrimams buvo pasirinktos šios trys gentys. Atlikus 16S rDNR sekos analizę bei filogenetinę analizę, izoliuoti mikroorganizmai turėjo didžiausią panašumą su *Pararhizobium giardinii* (IJAK2), *Paenibacillus xylanexedens* (IJAK19), *Bacillus mycoides* (IJAK94), *Pararhizobium giardinii* (IIBEI80), *Paenibacillus amylolyticus* (IIBEI61), *Bacillus pumilus* (IIBEI14), *Pararhizobium giardinii* (IIIDEG9), *Paenibacillus farraposensis* (IIIDEG36), *Priestia megaterium* rūšimis (IIIDEG93) **(3.3A–C pav.)**.

Trečioje tyrimo grupėje (2022 m.) iš *T. aestivum* šaknų rizosferos išskirtos gentys buvo *Bacillus*, *Pseudomonas* ir *Streptomyces*, kurios atitinkamai priklauso *Bacillota*, *Pseudomonadota* ir *Actinomycetota* bakterijų tipams **(3.8A–C pav.)**. Nors *Actinomycetota* tipo, kaip ir prieš tai einančių dviejų iš eilės metų tyrimų grupėse, rizosferos dirvožemyje buvo nustatytas didžiausias santykinis gausumas, tačiau *Streptomyces* gentis šiame bakterijų tipe pagal santykinį gausumą nebuvo labiausiai dominuojanti. Yra žinoma, kad *Streptomyces* veikia kaip biokontrolės agentas išskirdamas įvairius antibiotikus, produkuoja fitohormonus, tokius kaip IAA, giberelinais bei citokininai, prisideda prie fosforo ir geležies prieinamumo augalams, gali veikti sinergiškai su kitais mikroorganizmais (pvz. *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*) [239]. Tian ir kt. (2024 m.) atliktas tyrimas su *Streptomyces pratensis* S10 parodė, kad šios rūšies bakterija skatina kviečių augimą ir didina atsparumą *Fusarium graminearum* patogeniui. Taip pat produkuoja sideroforus, IAA, ACC deaminazę, dalyvauja fosforo tirpinime ir geba fiksuoti azotą. Inokuliacija su *Streptomyces pratensis* S10 pagerino kviečių vegetacijos procesus chlorofilo kiekį lyginant su neinokuliuotu bandymu [240]. Kitame tyrime buvo įvertintas kombinuoto inokuliuojimo su *Streptomyces pactum* Act12 ir *Streptomyces rochei* D74 poveikis kviečių fotosintezei, fiziologinėms savybėms ir derliui sausros sąlygomis. Apdorojimas *Streptomyces* rūšimis sumažino neigiamą poveikį, o kombinuotojo inokulianto (Act12+D74) grupė parodė didžiausią teigiamą poveikį ir padidino derlių 26,19 % palyginti su neinokuliuotu bandymu [241]. Taip pat parodyta, kad *Streptomyces* kartu su *Pseudomonas* ar *Bacillus*

gentimis gali veikti sinergiškai, tačiau tai priklauso nuo jų savybių, aplinkos sąlygų ir taikymo būdo, todėl būtina atlikti išsamesnius *in vitro* suderinamumo tyrimus. Literatūros analizė patvirtina, jog *Streptomyces* (pvz., *S. rochei*, *S. lydicus*) kartu su *Pseudomonas fluorescens* geriau slopina patogenų (*Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Pythium*) dauginimąsi, nes išskiria antibiotikus, tokius kaip streptomycinas ir piocianinas [242]. Kito tyrimo metu buvo analizuojami *Pseudomonas*, *Streptomyces* ir *Phyllobacterium* rūšių populiacijų pokyčiai kviečių rizosferoje skirtingais augimo etapais. Nors šis tyrimas nevertino tiesioginio bakterijų inokuliacijos poveikio, jis parodė, kad šios bakterijos yra gausios rizosferoje ir gali prisidėti prie fosforo mobilizacijos, kuri yra svarbi augalų vegetacijoje [243]. Kitame moksliniame straipsnyje autoriai pažymėjo, kad *Bacillus* sp. NMCN1 ir LLCG23 kamienai moduliudami fitohormonus, skatino *T. aestivum* augalų augimą [244]. Kita vertus, konkrečių tyrimų, kuriuose būtų tiriamas *Streptomyces* ir *Bacillus* derinio poveikis augalų vegetacijai ar derliui, nepavyko rasti. Tai gali būti dėl apsunkinto rūšių suderinamumo, kadangi joms būdingas antagonizmas, t.y. *Streptomyces* išskiriami antibiotikai gali slopinti kai kurias *Bacillus* rūšis, o *Bacillus* išskiria lipopeptidus, kurie neigiamai veikia *Streptomyces* augimą. Tolimesniems tarpusavio tyrimams su *T. aestivum* augalų kultūra, atlikus identifikavimo ir kamienų profiliavimą, pasirinktos *Bacillus toyonensis* (IJAK27), *Pseudomonas bijeensis* (IJAK44), *Streptomyces gardneri* (IJAK91), *Priestia aryabhattai* (IIBEI32), *Pseudomonas helmanticensis* (IIBEI40), *Streptomyces anulatus* (IIBEI22), *Bacillus tequilensis* (IIIDEG45), *Pseudomonas granadensis* (IIIDEG41) ir *Streptomyces badius* (IIIDEG72) rūšys (**3.4A–C pav.**).

Bendras mikroorganizmų charakterizavimas ir savybių įvertinimas papildė literatūros duomenis apie atrinktų mikroorganizmų gebėjimą gaminti NH_3 , HCN, ACC deaminazę, formuoti sideroforus, pasižymėti katalazės aktyvumu, fiksuoti atmosferos azotą, gebėti tirpdyti netirpius kalio ir fosforo junginius (**3.9 pav.**). Tačiau didžiausias dėmesys buvo skirtas atrinktų mikroorganizmų gebėjimui tirpinti netirpius fosfatinius junginius. Nustatyta, jog iš *Z. mays* rizosferos išskirtų izolatų geriausius rezultatus modifikuotoje NBRIP terpėje, į kurios sudėtį įėjo natūrali iškastinė fosfatinė uoliena iš Maroko, davė dviguba inokuliacija su IJAK92 + IJAK41 ($84,21 \text{ mg L}^{-1}$), dviguba inokuliacija su IIBEI11 + IIBEI19 ($75,60 \text{ mg L}^{-1}$) ir vienguba inokuliacija su IIIDEG4 ($94,20 \text{ mg L}^{-1}$). Trigubos inokuliacijos bandymai su *Bacillus*, *Pseudomonas* ir *Rhodococcus* rūšimis reikšmingų rezultatų neparodė (**3.10A–C pav.**). Tai galėjo priklausyti nuo netinkamų augimo sąlygų, t.y. netinkamos terpės sudėties ir anglies šaltinio, taip pat nuo lėto *Rhodococcus* ląstelių dalijimosi. Bandymuose, kuriuose nustatytos didžiausios tirpaus P koncentracijos

mitybinėje terpėje, buvo naudojamos bendros iš *Bacillus* ir *Pseudomonas* sudarytos inokuliacijos arba viengubos *Bacillus* inokuliacijos. Tai sutampa su literatūroje rasta informacija, jog labai svarbu sudaryti mišinius iš suderinamų mikroorganizmų rūšių. Ne visos *Bacillus* rūšys gali augti vienoje aplinkoje su *Pseudomonas* rūšimis, pavyzdžiui, *Pseudomonas fluorescens* gali išskirti HCN, kuris tam tikromis sąlygomis slopina kai kurias *Bacillus* rūšis, o *Bacillus subtilis* kai kuriomis sąlygomis išskiria biosurfaktantus, kurie veikia ir ardo *Pseudomonas* ląstelių membraną [245]. Vienaime tyrime nurodoma, kad *Pseudomonas fluorescens* ir *Bacillus* sp. kultivuojant NBRIP terpėje, kurioje kaip netirpus fosfato substratas naudotas trikalcio fosfatas ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), tirpus P koncentracija siekė atitinkamai $65,619 \mu\text{g mL}^{-1}$ ir $560,667 \mu\text{g mL}^{-1}$, tačiau nebuvo atliktas bendros šių rūšių inokuliacijos bandymas [246]. Iki šiol literatūroje nebuvo skelbiama informacijos apie bendros *Bacillus* ir *Pseudomonas* inokuliacijos poveikį netirpių fosfatinių junginių tirpinime, todėl gauti rezultatai yra svarbus indėlis, papildantis informaciją apie šių mikroorganizmų panaudojimo galimybę žemės ūkyje.

Ivykdžius eksperimentus nustatyta, kad iš *P. vulgaris* rizosferos išskirtų izoliatų geriausius rezultatus modifikuotoje NBRIP terpėje parodė trigubos inokuliacijos bandymai su IJAK2 + IJAK19 + IJAK94 ($93,38 \text{ mg L}^{-1}$), IIBEI80 + IIBEI61 + IIBEI14 ($85,75 \text{ mg L}^{-1}$) ir IIIDE9 + IIIDE936 + IIIDE93 ($98,18 \text{ mg L}^{-1}$) (**3.11A–C pav.**). Nors tyrimų metu nustatyta, jog *Pararhizobium* rūšys mišiniuose su *Paenibacillus* ir *Bacillus* neparodė gerų augimo rezultatų ($< 1,5 \times 10^4 \text{ KfV mL}^{-1}$), tačiau vis tiek gebėjo augti vienoje aplinkoje. Gauti rezultatai sutampa su literatūros duomenimis, jog nors šios rūšys yra aptinkamos dirvožemiuose, ypač augalų šaknų zonose, tačiau jų efektyvus suderinamumas priklauso nuo specifinių sąlygų – pH, maistinių medžiagų konkurencijos, išskiriamų metabolitų. Taip pat pažymima, jog *Paenibacillus* gali skatinti šaknų augimą ir taip netiesiogiai pagerinti *Pararhizobium* kolonizaciją augalų šaknyse. Nors *Pararhizobium* pagrinde žinoma dėl azoto fiksacijos, tačiau kai kurie kamieniai taip pat pasižymi fosforo tirpinimo gebėjimais dėl jų gebėjimo išskirti organines rūgštis [247, 248]. Nors specifiniai *Pararhizobium* fosforo tirpinimo rodikliai nėra plačiai dokumentuoti, kai kurie tyrimai rodo, kad panašios bakterijos, tokios kaip *Sinorhizobium meliloti*, gali išskirti ištirpusio fosforo koncentracijas nuo 500 iki 860 mg L^{-1} , priklausomai nuo augimo sąlygų ir susidariusių metabolitų [249]. Taip pat tiesioginiai *Paenibacillus* genties ir *P. vulgaris* sąveikos tyrimai dėl netirpių fosforo junginių tirpinimo yra mažai aprašyti, nors *Paenibacillus* gali turėti teigiamą poveikį augalų augimui ir maistinių medžiagų pasisavinimui, ypač dėl IAA išskyrimo. Pavyzdžiui, viename tyrime pademonstruotas *Paenibacillus sonchi* gebėjimas tirpinti

hidroksiapatitą, kuris yra netirpus fosfato šaltinis, o kitame tyrime *Paenibacillus polymyxa* sugebėjo ištirpinti iki 2635,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ fosfato per 5 inkubacijos paras, sumažindama terpės pH nuo 6,08 iki 3,28 [250]. Konkrečiai apie *Bacillus* ar *Prestia* genčių poveikį *P. vulgaris* fosforo įsisavinimui tyrimų nerasta, tačiau buvo nustatyta, jog *Bacillus* sp., izoliuotas iš *P. vulgaris* šaknų rizosferos, parodė stiprią antagonistinę veiklą prieš patogeną *Alternaria alternata* [251]. Konkrečių tyrimų apie *Pararhizobium*, *Paenibacillus* ir *Bacillus* bendrą inokuliaciją *P. vulgaris* nepavyko aptikti, tačiau viename tyrime *Bradyrhizobium japonicum* 5038, *Bacillus aryabhattai* MB35-5 ir *Paenibacillus mucilaginosus* 3016 buvo naudojami kaip AASM ir nustatyta, kad inokuliantai, sudaryti iš šių trijų skirtingų rūšių reikšmingai paveikė sojos pupelių biomasę ir azoto bei fosforo kiekį rizosferoje [252]. Apskritai šie rezultatai parodė, kad keli skirtingų funkcijų AASM gali būti sujungti į sudėtinis bakterinius inokuliantus, kurie koordinuoja rizosferos mikroorganizmų bendruomenės struktūrą ir pagerina ankštinių augalų vegetacijos procesus.

Darbo metu nustatyta, kad iš *T. aestivum* rizosferos išskirtų izoliatų geriausius rezultatus modifikuotoje NBRIP terpėje parodė trigubos inokuliacijos bandymai su IJAK27 + IJAK44 + IJAK91 (129,17 mg L^{-1}), dviguba inokuliacija IIBEI32 + IIBEI40 (90,95 mg L^{-1}) ir reikšmingų skirtumų nepastebėta tarp dvigubos inokuliacijos IIIDEG45 + IIIDEG41 (122,78 mg L^{-1}) ir trigubos inokuliacijos IIIDEG45 + IIIDEG41 + IIIDEG72 (120,78 mg L^{-1}) (**3.12A–C pav.**). *Streptomyces* gali būti naudojami kaip fosfatą tirpinantys mikroorganizmai dėl savo gebėjimo išskirti organines rūgštis, specialių fermentų (fosfatazių), kurios geba skaidyti fitatus, sideroforų sudarymo, kurie chelatuoja metalus ir taip atpalaiduoja fosforą iš aplinkos. *Streptomyces griseus* ir *Streptomyces lydicus* yra dvi dažniausiai minimos rūšys, kurios turi gebėjimą tirpinti fosforą ir yra naudojamos kaip mikrobiologiniai agentai pagerinti augalų augimą skatinančioms savybėms [253, 254]. Taikant *Pseudomonas moraviensis* ir *Bacillus safensis* inokuliatu *T. aestivum* derlius padidėjo iki 14,42 % palyginti su kontroliniu apdorojimu, nes šie mikroorganizmai galėjo veiksmingai tirpinti netirpius fosfatinius junginius bei gaminti IAA [255]. Literatūroje duomenų apie *Streptomyces* genties bendrą inokuliaciją su *Pseudomonas* ar *Bacillus* gentimis *T. aestivum* augimo skatinimui, ypač fosfatinių junginių tirpinime, nebuvo rasta. Tai yra svarbus faktorius renkantis suderinamus mikroorganizmų mišinius *T. aestivum* augalų vegetacijai ir geresniam fosforo prieinamumui.

Remiantis rezultatais, gautais tyrimo dalyje su modifikuota NBRIP terpe, kurios sudėtyje buvo gamtinės kilmės iškastinis fosfatas iš Maroko, iš kiekvienos tyrimo grupės atrinkti reikšmingiausiomis tirpaus fosforo

koncentracijomis pasižymintys bandymo variantai. Taikant skysčių chromatografijos-masių spektrometrijos (LC-TOF/MS) metodą atlikta organinių rūgščių analizė NBRIP terpės supernatantuose. Nustatyta, kad pirmoje tyrimo grupėje didžiausias pieno, acto, gliukono, obuolių, oksalo ir citrinos rūgščių koncentracijas išskyrė bandymo variantas su vienguba *Priestia* sp. IIIDEG4 inokuliacija (nuo 13,5 iki 419 $\mu\text{g mL}^{-1}$), antroje grupėje didžiausias minėtų organinių rūgščių koncentracijas parodė dviguba inokuliacija su *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 + *Priestia* sp. IIIDEG93 (nuo 14 iki 433 $\mu\text{g mL}^{-1}$), o trečioje tyrimo grupėje – triguba inokuliacija su *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91 (nuo 1,2 iki 567 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (**3.5 lentelė**). Atsižvelgiant į gautus analizių rezultatus ir remiantis literatūros šaltiniais nuspręsta tolimesniems tyrimams pasirinkti šiuos tris bandymo variantus siekiant optimizuoti jų augimo sąlygas bei panaudojimą tiriamosioms augalų kultūroms. Trims bandymo variantams buvo naudota minimalios sudėties mitybinė terpė, o tyrimo eigoje terpėje pakeistas vienas iš substratų vertinant ląstelių skaičiaus pokyčius per nustatytą inkubacijos periodą (48 val.). Kaip anglies šaltiniai pasirinkti dažniausiai mitybinėse terpėse naudojami, tačiau skirtingą sandarą turintys monosacharidas gliukozė, disacharidas sacharozė, polisacharidas krakmolai, organinio alkoholio šaltinis glicerolis ir kompleksinis organinis anglies šaltinis melasa. Nors universaliausiu anglies šaltiniu yra laikoma gliukozė dėl savo nesudėtingos struktūros ir lengvo daugumos bakterijų įsisavinimo, tačiau mūsų tyrimo rezultatai parodė, jog tinkamiausias anglies šaltinis yra melasa [256]. Melasa, kaip anglies šaltinis, dažniausiai yra taikoma pramoniniuose fermentacijos procesuose dėl savo mažos kainos ir plataus prieinamumo, taip pat sudėtyje turi lengvai pasisavinamų cukrų, vitaminų (ypač B grupės), mineralų (Fe, K, Mg), o melasos panaudojimas pramonėje prisideda prie žiedinės ekonomikos ir atliekų mažinimo, nes melasa yra cukraus gamybos šalutinis produktas [257]. Tačiau yra rizikų, nes ji yra kompleksinė ir priklausomai nuo šaltinio (cukranendrės ar runkeliai) ir gamybos proceso, melasos cheminė sudėtis gali labai kisti. Taip pat sudėtyje gali būti inhibitorių, tokių kaip sunkieji metalai ar sulfitai, kurie gali slopinti mikroorganizmų fermentaciją [258, 259]. Organinių šaltinių pritaikyme geriausius rezultatus parodė mielių ekstraktas ir sojų pupelių peptonas. Yra žinoma, kad mielių ekstraktas labai naudingas bakterijų augimui, nes jame yra baltymų, aminorūgščių, vitaminų (ypač B grupės), mineralų, nors nėra pigiausias iš visų pasirinkimų, bet yra prieinamas ir naudojamas daugybėje pramoninių procesų [260]. Sojų pupelių peptono sudėtyje yra didelės baltymų ir aminorūgščių koncentracijos, todėl jis yra labai naudingas bakterijų augimui, o pramonėje dažnai naudojamos dėl pakankamai žemos kainos [261]. Agropeptonas yra

ypač pigus organinis šaltinis, nes sudarytas iš organinių augalinės ir gyvulinės kilmės atliekų, tačiau mažesnės kokybės lyginant su mielių ekstraktu ar sojų pupelių peptonu. Mėšos ekstraktas ir jaučio sultinio ekstraktai yra pakankamai brangūs, todėl vengtini naudoti pramonės procesuose ir didelio masto fermentacijose [262]. Amonio fosfatas visais atvejais buvo nustatytas kaip tinkamiausias azoto šaltinis mitybinėje terpėje, nes amonio jonai (NH_4^+) yra greitai metabolizuojami daugelio bakterijų, todėl šis junginys gali greitai aprūpinti bakterijas reikalingu azoto kiekiu, o fosforas (H_2PO_4^-) yra svarbus bakterijų energijos mainams (per ATP), nukleotidų sintezei ir ląstelių struktūrai todėl amonio fosfatas tinka kaip dvigubas mitybos šaltinis [263]. Atlikus analizes su pH variacijomis fermentacijos procesuose, rezultatai patvirtino literatūroje randamą informaciją, jog tinkamiausia pH vertė ląstelių fermentacijos procesuose svyruoja nuo 6,5 iki 7,5. Tam, kad mikroorganizmų ląstelių augimas būtų optimalus, proceso metu būtina reguliuoti pH naudojant korektorius, kurie sumažina arba pakelia terpės pH, o labiausiai naudojami pramonėje yra natrio arba kalio šarmas ir druskos arba sieros rūgštis [264]. Apžvelgiant temperatūros poveikį izoliuotų mikroorganizmų kultivavimui nustatyta, jog kaip ir visiems mezofiliniams dirvožemio mikroorganizmams optimali augimo temperatūra yra 25–30 °C. Taip pat nurodoma, jog tai tipiška vasaros dirvožemio temperatūra vidutinio klimato zonose, kur mikroorganizmų aktyvumas būna didžiausias ir ši temperatūra užtikrina optimalų fermentų aktyvumą, DNR replikaciją ir ląstelių dalijimąsi daugumai mezofilinių mikroorganizmų [265] (**3.13–3.15 pav.**).

Kaip parodė fermentacijos procesų tyrimų rezultatai (**3.16 pav.**), optimalus procesų stabdymas vyko ties 55–60 val., o tai sutampa su literatūroje randama informacija, jog mikroorganizmų sporų susidarymo laikas priklausomai nuo mikroorganizmų rūšies ir aplinkos sąlygų svyruoja nuo 24 iki 78 val. [266]. Tai ypač svarbu kuriant mikrobiologinius produktus, nes bakterijų sporos yra atspautos itin ekstremalioms sąlygoms (karščiui, šalčiui, UV spinduliuotei), pailgina produktų galiojimo laiką, o sporų dygimas vyksta tik tada, kai jos patenka į palankią aplinką, be to toks prisitaikymas sumažina produktų transportavimo ir sandėliavimo kaštus. Dažnai mikroorganizmai fermentuojami atskirai, tada jų sporos sumaišomos į vieną produktą – taip užtikrinama kiekvieno kamieno kokybė ir veiklumas [267]. Nors mūsų tyrime įrodėme, kad skirtingos mikroorganizmų rūšys geba augti vienoje aplinkoje, tačiau svarbu atrinkti tinkamas rūšis, kurios neslopintų viena kitos augimo ir bendra mikroorganizmų inokuliacija pramoniniu atžvilgiu būtų sąnaudų bei laiko sutaupymas.

Augalų hormonų nustatymas ir jų koncentracijos įvertinimas ir gauti rezultatai papildė literatūros duomenis apie mikroorganizmų gebėjimą

sintetinti fitohormonus, tokius kaip auksinai, citoninai, giberelinai ir abscizo rūgštis. Mūsų tyrimai parodė, kad didžiausios IAA, GA3 ir abscizo rūgšties koncentracijos gautos taikant trigubą *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91 inokuliaciją, tačiau priešingai didžiausia zeatino koncentracija gauta naudojant viengubą *Priestia* sp. IIIDEG4 inokuliaciją (3.6 lentelė). Tai įrodo iškeltą hipotezę, jog sinergiškai veikiantys mikroorganizmai ne visada duoda geresnius rezultatus fitohormonų išskyrimo nei kultivuojant tik vieną atrinktą mikroorganizmą. Tačiau išsiaiškinti pagrindines priežastis ir įvertinti tolimesnes galimybes – ateities tyrimų uždavinys.

Literatūroje randama daug informacijos, jog tas pats mikroorganizmas gali sukelti skirtingą efektą skirtingų augalų rūšių augimui. Šiame tyrime iš konkrečių augalų rizosferos išskirti mikroorganizmai buvo naudojami kryžminiuose bandymuose, t. y. bandymai atliekami ir su kitomis, šiame darbe naudojamomis augalų kultūromis. Nustatyta, jog *Z. mays* augalų geriausi augimo indeksų rezultatai (5 iš 6 indeksų) gauti augalus paveikus *Priestia* sp. IIIDEG4 izoliatu, kuris buvo izoliuotas ir atrinktas iš *Z. mays* šaknų rizosferos kaip AASM. Dviguba inokuliacija *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 + *Priestia* sp. IIIDEG93 neparodė reikšmingų rezultatų *P. vulgaris* augalų vegetacijos procesuose (4 iš 6 indeksų), kadangi vienguba inokuliacija *Priestia* sp. IIIDEG4 ir triguba inokuliacija *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91 parodė panašius rezultatus (4 iš 6 augimo indeksų). *T. aestivum* apdorojime reikšmingiausius rezultatus parodė triguba inokuliacija *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91 (6 iš 6 augimo indeksų) (3.7 lentelė). Pagal gautus tyrimo rezultatus galima kelti hipotezę, jog ne visais atvejais gausesnis mikroorganizmų rūšių panaudojimas augalų kultūroms suteikia geresnius vegetacijos parametrus arba mikroorganizmų mišiniai turi būti pritaikyti, detalai išanalizuoti. Kiekvienas mikroorganizmas turi savo specifines sąveikas su skirtingomis augalų rūšimis [268]. Mikroorganizmų veikimas labai priklauso nuo augalų šaknų struktūros. Skirtingi augalai gali turėti skirtingas šaknų struktūras (pvz., šaknų ilgis, šaknų eksudatai), o tai gali turėti įtakos mikroorganizmų gebėjimui kolonizuoti šaknis [269].

Apibendrinant galima teigti, kad mikroorganizmų pritaikymas žemės ūkio praktikoje yra puiki priemonė siekiant pagerinti žemės ūkio augalų produktyvumą atsižvelgiant į ekologines problemas bei modifikuojant jau turimų mikrobiologinių produktų savybes ar kuriant naujus produktus, kurie papildo natūralius, gamtoje natūraliai egzistuojančius augalų augimą skatinančius mikroorganizmus. Pirmiausiai, tai pagrįsta sinerginiu tarpusavio poveikiu, nes skirtingi mikroorganizmai gali papildyti vienas kito funkcijas, o

ir turėti didesnį poveikio spektrą, kadangi įvairūs mikroorganizmai gali skatinti skirtingas augalo funkcijas (šaknų vystymąsi, maistinių medžiagų įsisavinimą, atsparumą abiotiniams ir biotiniams veiksniams, metabolitų išskyrimą) [270]. Mikrobiologiniai preparatai, sudaryti iš skirtingų rūšių mikroorganizmų, turi skirtingus tolerancijos lygius netinkamoms aplinkos sąlygoms, tad didesnė tikimybė, kad bent dalis inokulianto bus veiksmingas įvairiomis sąlygomis. Kai kurie mikroorganizmai slopina augalų patogenus arba konkuruoja su jais dėl nišų ir išteklių, o tai mažina ligų riziką [271]. Tačiau mikroorganizmų sąveika ne visada būna teigiama – kai kurios mikroorganizmų rūšys gali konkuruoti tarpusavyje, o net jei mikroorganizmai neveikia antagonistiskai vienas kito atžvilgiu, jų mišinių efektyvumas priklauso nuo dirvožemio savybių, augalo rūšies bei klimato sąlygų [272]. Vienos svarbiausių dirvožemio savybių yra dirvožemio pH, organinės medžiagos kiekis, drėgmė bei aeracija, vietinė dirvožemio mikrobiota [273]. Kiekviena augalo rūšis privilejoja specifinius mikroorganizmus moduluojant jų sudėtį šaknų išskiriamais eksudatais, o aplinkos sąlygos dar labiau apsunkina šį uždavinį, nes mikroorganizmų dauginimuisi reikalinga optimali temperatūra (pvz., 25–30 °C), tad sausra ar per didelė drėgmė sukelia augalų stresą, kuris keičia augalo šaknų išskiriamas biologiškai aktyvias medžiagas, kurios savo ruožtu keičia mikroorganizmų gebėjimą kolonizuoti augalo šaknis [274]. Mikroorganizmų mišinio veiksmingumas nėra universalus, o tai reiškia, jog tas pats mikroorganizmų derinys vienoje vietoje gali veikti labai gerai, o kitoje – visai neveikti arba net pakenkti. Todėl toks mišinys turi būti pritaikytas konkrečioms sąlygoms. Pavyzdžiui, naudojant *Azospirillum*, *Bacillus subtilis* ir *Trichoderma* mikroorganizmų mišinį šiek tiek rūgštaus pH dirvožemyje, turinčio pakankamai drėgmės ir grūdinėms augalų kultūroms padidėja šaknų masė ir azoto įsisavinimas; tačiau pritaikius tą patį mikroorganizmų derinį molingame šarminiame dirvožemyje, kuris pasižymi mažu organinių medžiagų kiekiu bei kultivuojant jame pupeles, gaunami prasti rezultatai: *Azospirillum* netinkamos sąlygos dauginimuisi, o *Trichoderma* tampa neaktyvi dėl šarminio pH [275, 276]. Todėl norint pasiekti gerą rezultatą, reikia žinoti lauko sąlygas ir tada pasirinkti tinkamas mikroorganizmų rūšis, derinti jas pagal jų tarpusavio sąveiką ir prisitaikymą prie sąlygų, testuoti arba naudoti jau išbandytus inokuliantus konkrečioms kultūroms. Natūraliai gamtoje randamų mikroorganizmų pritaikymas ir detalesni jų panaudojimo tyrimai yra puikus naujas mikrobiologinių trąšų šaltinis [277]. Dauguma mikrobiologinių produktų yra sudaryti iš vienos rūšies mikroorganizmų. Kompleksinių biologinių trąšų, t. y. kelių mikroorganizmų genčių ar rūšių mišinio, kūrimas yra daug laiko bei darbo reikalaujantis procesas [278]. Tokie preparatai efektyviai gali pakeisti įvairius

žemės ūkyje naudojamus cheminius preparatus ar būti geresnė alternatyva jau žinomiems komerciniams mikrobiologiniams preparatams [279]. Šiame darbe aptarti rezultatai ne tik praplečia žinias apie mikroorganizmų įvairovę, funkcijas ir pritaikymo potencialą, bet ir suteikia pagrindą tolimesniems šios tematikos tyrimams. Ateityje būtina atlikti eksperimentus ir analizes natūraliuose dirvožemiuose, siekiant patvirtinti atrinktų izoliatų ar jų mišinių efektyvumą realiomis lauko sąlygomis. Bandymai laukuose su mikroorganizmais yra būtini, nes tik realiomis sąlygomis galima įvertinti jų tikrąjį efektyvumą, veikimo stabilumą ir praktinį pritaikomumą. Nors laboratoriniai ir šiltnamio eksperimentai yra svarbūs pradiniai žingsniai, jie neatspindi visos ekologinės ir agronominės realybės [280]. *SynComs* struktūros strategija turi būti augalų fenotipo atrankos ir pažangesnių bei tikslesnių metodų, tokių kaip metatranskriptominė, metagenominė ir metabolominė sekos, derinys, kad būtų galima geriau modeliuoti tikslingo *SynComs* dizaino nuspėjamuosius bruožus [281].

IŠVADOS

1. Mikrobiotos santykinio gausumo tyrimų rezultatai parodė, jog šiame darbe izoliuotos rizosferinių mikroorganizmų gentys priklausė *Actinomycetota* (*Rhodococcus* spp., *Streptomyces* spp.), *Pseudomonadota* (*Pseudomonas* spp., *Pararhizobium* spp.) ir *Bacillota* (*Paenibacillus* spp., *Bacillus* spp., *Priestia* spp.) tipams.

2. Nustatyta, kad iš *Z. mays* šaknų rizosferos izoliuotų *Bacillus* (arba *Priestia*), *Pseudomonas* ir *Rhodococcus* genčių geriausias fosfatinių junginių tirpinimo potencialus parodė vienguba inokuliacija *Priestia* genties mikroorganizmu; iš *P. vulgaris* šaknų rizosferos izoliuotų *Pararhizobium*, *Paenibacillus* ir *Bacillus* (arba *Priestia*) genčių geriausias fosfatinių junginių tirpinimo potencialus parodė dviguba *Paenibacillus* ir *Priestia* genčių mikroorganizmų inokuliacija; iš *T. aestivum* šaknų rizosferos izoliuotų *Bacillus* (arba *Priestia*), *Pseudomonas* ir *Streptomyces* genčių geriausias fosfatinių junginių tirpinimo potencialus parodė triguba *Bacillus*, *Pseudomonas* ir *Streptomyces* genčių mikroorganizmų inokuliacija.

3. Didžiausias organinių (pieno, acto, gliukono, obuolių, oksalo ir citrinų) rūgščių koncentracijos aptiktos *Priestia* sp. IIIDEG4, *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 + *Priestia* sp. IIIDEG93 ir *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91 suspensijose.

4. Optimizuoti *Priestia* sp. IIIDEG4, *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 + *Priestia* sp. IIIDEG93 ir *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91 mitybinės terpės ir augimo parametrai: kaip anglies šaltinis geriausiai veikė melasa, kaip organinis šaltinis – mielių ekstraktas arba sojos pupelių peptonas, kaip azoto šaltinis – amonio fosfatas. Fermentacijų metu optimali pH vertė svyravo nuo 6,5 iki 7,5, o proceso temperatūra $30 \pm 0,5$ °C.

5. Nustatyta, kad *Priestia* sp. IIIDEG4, *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 + *Priestia* sp. IIIDEG93 ir *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91 fermentacijų metu išskirti augalų hormonai: indol-3-acto rūgštis, zeatinas, GA3 ir abscizo rūgštis.

6. Nustatyta, kad *Z. mays* geriausia vegetacija aptikta taikant viengubą *Priestia* sp. IIIDEG4 inokuliaciją; *P. vulgaris* augalų vegetacijoje neaptikta jokių reikšmingų skirtumų tarp visų trijų bandymo variantų; o *T. aestivum* geriausi augalų vegetacijos rezultatai gauti taikant trigubą *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91 inokuliaciją.

SUMMARY OF DOCTORAL DISSERTATION

INTRODUCTION

The most important challenge for an agrarian society is to increase the yield of agricultural crops and to meet the increased food needs of the population in the future [1]. Meeting this challenge requires a strong focus on soil biodiversity and the agroecosystem in order to better understand the complex processes and their interactions in the management of agricultural machinery [2]. Sustainable agriculture is vital to modern human life. It enables us to meet our agricultural needs, conserve, protect and improve the environment and natural resources, and contribute to economic and social development [3,4].

Soil fertility and agricultural production are strongly influenced by the use of plant protection and growth-promoting measures [5]. According to the United Nations Food and Agriculture Organisation (FAO), which is one of the largest specialised organisations in the United Nations system with 194 countries worldwide, without the use of plant protection products, the loss of agricultural production from various plant diseases, pests and weeds is 50% or more annually worldwide [6]. In contrast, the use of biological plant protection and growth promoters has been proven by a large body of research, which aims not only to increase the yield of agricultural crops, but also to minimise the negative impact on the environment [7].

In recent years, soil fertility has been declining worldwide. Soil degradation is primarily caused by direct human intervention: tillage, the use of chemical fertilisers and pesticides, and other social and economic activities [8]. The main factors reducing soil fertility are global climate change, temperature increases, changing soil moisture and water stress, and the rapid decline of organic and mineral matter available for plant development. The most important link to a healthy, fertile and productive soil is the microorganisms that are essential for maintaining nutrient cycling and fertility [9].

Recently, with the rapid development of biotechnology, microbiological approaches are increasingly being used to help restore degraded soils. One of the most important discoveries is the introduction of microorganisms into the soil or into the plant parts [10]. Microbial products contain naturally occurring substances and beneficial microorganisms that can be used to activate seeds, plants or soil. Viable microorganisms introduced into the soil with microbiological products multiply and thus occupy a key ecological niche, preventing the dominance of harmful disease-causing microorganisms [11]. The use of bioproducts in plants improves the nutritional efficiency of plants,

induces changes in vital and structural processes to affect plant growth, improves tolerance to abiotic and biotic stresses, and increases the yield and quality of products [12]. In order to counteract all these stresses and to improve soil productivity and plant yields, new biotechnologies and the development of a variety of innovative bio-based products have received worldwide attention.

The aim of the work:

Develop a prototype(s) of a microbial product for agricultural crops to stimulate plant vegetative processes.

The following tasks have been formulated to achieve this aim:

1. To determine the relative abundance of the microbiota in rhizosphere soils of different agricultural crops;
2. isolation and identification of target microorganisms with plant growth-promoting properties;
3. To optimise the composition of the nutrient media and the controlled growth parameters of the selected microorganisms or mixtures of microorganisms by fermentation processes in 5.4 L laboratory volume bioreactors (EDF 5.4_1);
4. To evaluate the ability of microorganisms to release bioactive compounds and the effect of inoculation of these microorganisms on plant vegetative processes.

SCIENTIFIC NOVELTY

Organic farming is now a major focus worldwide. It is seen as a viable alternative to conventional agriculture. This type of farming uses special farming techniques in which chemical and mineral fertilisers are replaced in the cultivation technology by the introduction of microbiological preparations, which include non-pathogenic microorganisms, various enzymes or other biologically active substances necessary for plant vegetation. The benefits of microbial fertilisers for plants and soil are based on the introduction of additional microorganisms into the soil to increase the microbial diversity of the soil and to stimulate the natural processes occurring therein [13]. The population of microorganisms in the soil is important for key processes that contribute to the stability and productivity of agroecosystems. A wide range of research is being carried out in the field of science to find the optimal way to achieve the right composition and functionality of the soil microbiota for plant vegetative processes [14]. Worldwide, commercial microbiological

preparations have been available on the agricultural market for about 120 years, but have only received special attention in recent decades [15].

The project will develop an innovative prototype bio-product to improve plant vegetative processes. It will combine microorganisms isolated and selected from the root rhizosphere of different agricultural plants, which release biologically active compounds that promote plant vegetative processes. The research project hopes to find the most compatible composition of the selected microorganisms that will be able to provide plants with an efficient nutrient supply and resistance to abiotic and biotic stresses.

The overall development of microbial biopreparations and the research carried out in the research project will help to better understand the benefits of microorganisms in the agricultural sector. The isolation and application of specific microorganisms to specific crops is a time-consuming and analytical exercise and a novelty today. The hope is to find the most promising strategy for inoculating soil and crops with microorganisms, which will improve plant vegetation and thus reduce the use of chemical and mineral fertilisers that have a negative impact on the environment, while at the same time being a simple, cost-effective and environmentally friendly process.

Statements to be defended:

1. *Actinomycetota*, *Pseudomonadota* and *Bacillota* bacterial phyla are the most dominant in rhizosphere soils in *Z. mays*, *P. vulgaris* ir *T. aestivum* agricultural crops.
2. A mixture of two or three isolated microorganisms belonging to different bacterial types can act synergistically and lead to better dissolution properties of insoluble phosphate compounds and higher concentrations of organic acids.
3. *Priestia* sp. IIIDEG4, *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 + *Priestia* sp. IIIDEG93 and *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91 are capable of produce plant hormone synthesis.

MATERIALS AND METHODS

The chapter “Materials and Methods” of the final thesis presents biologically derived materials, reagents, solutions, and substrates, as well as research methods used in this work. Methods of classical microbiology and molecular microbiology, bioinformatic analysis, molecular biology, industrial biotechnology, and plant physiology were applied to conduct research and experiments. Many protocols of scientific research methods have been modified and adapted specifically to achieve the results of this research work.

Materials

Reagents, solutions, and substrates

All reagents and solutions used in the thesis are of recognized analytical quality and are offered by manufacturers such as Merck (Germany), Sigma-Aldrich (USA), AppliChem (Germany), Thermo Fisher Scientific (USA), VWR Chemicals (USA), Biosigma S.r.l. (Italy), CarlRoth (Germany), Chempur (Poland), unless otherwise stated in the workflow. The substrates used in the research work are substances of natural origin commonly found in nature unless otherwise stated.

Biologically derived substances

All bacterial strains used in this work were isolated from the rhizosphere of different plant roots growing in Lithuanian agricultural fields. The list of bacterial strains isolated and selected for the study is presented in **Table 1**.

Table 1. List of bacterial strains used in the research work.

Strain	Description	Source
2020 years		
IJAK92	<i>Bacillus</i> genus	Common corn (lat. <i>Z. mays</i>)
IJAK41	<i>Pseudomonas</i> genus	
IJAK17	<i>Rhodococcus</i> genus	
IIBEI11	<i>Bacillus</i> genus	
IIBEI19	<i>Pseudomonas</i> genus	
IIBEI38	<i>Rhodococcus</i> genus	
IIIDEG4	<i>Priestia</i> genus	
IIIDEG59	<i>Pseudomonas</i> genus	
IIIDEG40	<i>Rhodococcus</i> genus	
2021 years		
IJAK2	<i>Pararhizobium</i> genus	Common bean (lat. <i>P. vulgaris</i>)
IJAK19	<i>Paenibacillus</i> genus	
IJAK94	<i>Bacillus</i> genus	
IIBEI80	<i>Pararhizobium</i> genus	
IIBEI61	<i>Paenibacillus</i> genus	
IIBEI14	<i>Bacillus</i> genus	
IIIDEG9	<i>Pararhizobium</i> genus	
IIIDEG36	<i>Paenibacillus</i> genus	
IIIDEG93	<i>Priestia</i> genus	

2022 years		
IJAK27	<i>Bacillus</i> genus	
IJAK44	<i>Pseudomonas</i> genus	
IJAK91	<i>Streptomyces</i> genus	
IIBEI32	<i>Bacillus</i> genus	Common wheat (lat. <i>T. aestivum</i>)
IIBEI40	<i>Pseudomonas</i> genus	
IIBEI22	<i>Streptomyces</i> genus	
IIIDEG45	<i>Bacillus</i> genus	
IIIDEG41	<i>Pseudomonas</i> genus	
IIIDEG72	<i>Streptomyces</i> genus	

The table shows the three consecutive years of crop rotation on the same three agricultural fields and the crops cultivated on them. Three different bacterial genera were selected from each agricultural field in each year of the rotation, depending on the crop cultivated and the results of the subsequent tests.

Methods

Soil sample collection

Soil samples were collected between 2020 and 2022 from three different agricultural fields located in the village of Pušalotas, Pasvalys District, Panevėžys County, Lithuania, where the same crop rotation technology was applied. Each agricultural field was coded with three different names: Jakuboniai (JAK), coordinates 55°54'00.3 "N 24°06'44.3 "E, classified as neutral (pH 7.08); Beicarke (BEI), coordinates 55°55'53. 6 "N 24°16'46.2 "E, classified as slightly acidic (pH 6,11); and Deglenai (DEG), coordinates 55°56'17.8 "N 24°08'26.9 "E, classified as slightly alkaline (pH 8,00). The first soil samples from all three agricultural fields were collected in September 2020, 14 days before the harvest of *Z. mays* (variety *CRANBERRI CS*; *Lidea*, France); the next soil samples were collected in August 2021, 14 days before the harvest of *P. vulgaris* (variety *FANFARE C2*; *NPZ*, Germany); the last soil samples were collected in August 2022, 14 days before the harvest of *T. aestivum* (variety *ARTIST C2*; *Deutsche Saatveredelung*, Germany).

At the study sites, bulk soil samples were collected from a depth of 0–20 cm. Each soil sample was collected from seven different points in each agricultural field and mixed to obtain three composite homogeneous soil samples. In each study year, three composite soil samples (1 composite soil sample × 3 fields) were placed in separate 150 mL sterile polypropylene bags,

coded as JAK, BEI, and DEG, and immediately transported to the laboratory for soil agrochemical characterization [195].

Z. mays CRANBERRI CS, *P. vulgaris* FANFARE C2, and *T. aestivum* ARTIST C2 plant cultures were used to isolate plant growth-promoting rhizobacteria from the rhizosphere soil of these plant roots. Seven plants were uprooted from each plot, along with the soil surrounding the plant roots, and immediately transported to the laboratory for further analysis in sterile, resealable sampling bags. Large soil aggregates and non-rhizosphere soil were removed by vigorous shaking of the plants. Soil adhering to the roots of each of the seven plants was collected separately to obtain a complex rhizosphere soil sample. Three complex rhizosphere soil samples (1 complex rhizosphere soil sample $\times$ 3 fields) were collected and coded with the same names as the bulk soil samples. All soil samples were stored in the dark at 4 °C for further analysis [196].

Agrochemical analysis of soil samples

The collected bulk soil samples were air-dried in a thermostatic incubator SNOL 220/300 LSN11 (SnolTherm, Lithuania) at a temperature of approximately 20–25 °C for about 24 hours. The dried soil samples were sieved through a 2 mm sieve to separate and remove larger aggregates, and the sieved soil samples were thoroughly homogenized [197].

The hydrogen potential ($\text{pH}_{\text{CaCl}_2}$) of the soil samples was determined by electrochemical (potentiometric) analysis method (ISO 10390:2021) using a 0.01M CaCl_2 salt solution [198]. The calcium chloride solution was prepared by dissolving 1.47 g $\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$ salt in 1 L deionized H_2O . Homogenized soil samples were added with 75 mL of 0.01M $\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$ solution. The calcium chloride and soil mixtures were shaken for 60 min using an incubation shaker Biosan ES-20/60 (Biosan, Latvia). The mixed soil samples and salt solution were left to settle for two hours. Soil pH was measured using a pH electrode with a glass body edge[®] HI2002-0 (Hanna instruments, Italy) in triplicate.

P_2O_5 and K_2O were determined using the Mehlich 3 (M3) extraction method [199]. Mehlich 3 solution consists of three main components: 0.2M CH_3COOH , 0.25M NH_4NO_3 , and 0.015M NH_4F (solution pH about 2.5). For the determination of P_2O_5 , soil samples were first extracted using Mehlich 3 solution, while phosphorus was determined photometrically with a molybdate-ammonium reagent, forming a phosphoric molybdate complex, the concentration of which was determined by a colour reaction, while K_2O was determined using flame photometry.

Organic carbon (C_{org}) was determined by burning soil samples at a temperature of at least 900 °C (ISO 10694:1995) [200]. The method is based on the oxidation reaction of $K_2Cr_2O_7$ catalysed by H_2SO_4 acid. The main objective of the process is to oxidize organic carbon-related material in the soil so that its amount can be determined based on the amount of potassium dichromate consumed during the oxidation.

Nitrogen (N) was determined by the Kjeldahl method using concentrated H_2SO_4 acid and a decomposition catalyst (copper sulfate) and converting organic N to inorganic ammonium (NH_4^+) [201]. Ammonium (NH_4^+) is distilled using sodium hydroxide (NaOH), and the resulting ammonia (NH_3) is dissolved in distilled water. The resulting ammonia solution is titrated using HCl and an indicator, which helps determine how much HCl acid was consumed during the colour reaction to neutralize NH_3 .

Isolation of plant growth-promoting rhizobacteria

One gram of soil from each complex rhizosphere sample was mixed with 9 mL of sterile distilled water, which was diluted 1:10 and incubated in a shaker BJPX-2102 (Biobase, China) at 30 ± 0.5 °C, 130 rpm for 30 min. After the incubation period, 100 μ L of the stock solution was transferred to a 1.5 mL tube containing 900 μ L of sterile distilled water using the serial dilution method to obtain a 10^{-1} dilution. The serial dilution method was repeated up to a 10^{-5} dilution. Next, 100 μ L of the suspension from each dilution was spread onto Luria-Bertani (LB) agar plates containing the following ingredients per L^{-1} : tryptone, 10 g; yeast extract, 5 g; NaCl, 10 g; and agar, 15 g. The pH of the medium was adjusted to 7.0 ± 0.2 before autoclaving at 121 °C for 15 minutes and after the sterilization process, the medium was poured into sterile Petri dishes (approximately 20 mL per dish). The serial dilution suspensions were spread on the appropriate agar surface and incubated at 30 °C for 48–72 hours. Morphologically distinct colonies, which were considered to be plant growth-promoting rhizobacteria, were replated and subcultured several times onto LB agar medium to purify single colonies and incubated at 30 °C for 48–72 hours [98, 103]. All isolates used in the research work were frozen at -80 °C using a 50% glycerol (v/v) solution for further analysis and deposited in the collection “CRANBERRI CS, FANFARE C2 and ARTIST C2 plant growth-promoting bacteria isolated from the rhizosphere” of JSC "Bioenergy LT" in Panevezys, Lithuania.

Molecular identification and phylogenetic analysis

Partial sequences of the 16S rRNA genes of bacterial strains were amplified using universal primers specific for bacteria: 27F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and 1492R (5'-ACCTTGTTACGACTT-3'). For the amplification of DNA fragments, a mixture of the following components was prepared: 10× *Taq* buffer solution, primers at 0.5 μM, 2 mM dNTP mixture at 0.2 mM of each dNTP, 1 mM MgCl₂, 10 ng of template DNA, *Taq* polymerase 2.5 U/100 μL reaction mixture and water to 100 μL. The prepared mixtures were placed in a thermocycler (Bio-Rad Laboratories, USA). The following amplification conditions were used: initial denaturation for 5 min. at 94 °C, 35 denaturation cycles of 30 sec. at 94 °C, heating for 30 sec. at 58 °C, extension for 30 sec at 72 °C and final extension for 7 min at 72 °C. After the reaction, the samples were stored at 4 °C until analysis. The obtained DNA fragments were analyzed in a DNA electrophoresis agarose gel.

A horizontal 1% agarose gel (SIGMA®) was used to visualize DNA fragments by electrophoresis (Maxi Horizontal Electrophoresis System, Thistle Scientific, Scotland). The agarose gel was poured with 1× TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 0.1 mM EDTA, pH 8.3) and boiled for several minutes until it became homogeneous and clear, and then cooled to 40-50 °C and ethidium bromide was added to a final concentration of 0.5 μg mL⁻¹. The agarose solution was allowed to cool and poured into a special gel-forming system with built-in combs that form tracks. After the agarose gel has solidified, a mixture of DNA length standards (GeneRuler DNA Ladder Mix, 100-10000 bp, Thermo Fisher Scientific, USA) is added to the wells and the samples are analyzed. Electrophoresis is performed at a voltage of 100 V for about 30–40 min. After electrophoresis, the gel is illuminated with UV light using the DNA Bio-Imaging System electrophoresis results capture system (MiniBIS Pro, Germany) [103]. The nucleotide sequence determined during the analysis is compared with the sequences in the NCBI GenBank database. The search for mutual similarities and identification of conservative sequence domains were performed using the NCBI BLAST and EBI FASTA programs.

Phylogenetic trees were constructed based on 16S rRNA gene sequences using the Neighbor-Joining method using MEGA 11 (Molecular Evolutionary Genetics Version 11 Analysis) software (University of Pennsylvania, Philadelphia, USA). The Maximum Composite Likelihood method was used to calculate distances indicating the course of haplotype variation (evolution). The statistical reliability of the phylogenetic tree was assessed using the bootstrap analysis method of cluster analysis, using 1000 permutation matrices in the MEGA 11 program.

ZymoBIOMICS® Targeted Sequencing

Rhizosphere soil samples were processed and analysed using the ZymoBIOMICS® Targeted Sequencing Service according to the manufacturer's instructions (Zymo Research, Irvine, CA, USA). Sequencing targeting bacterial 16S ribosomal RNA genes was performed using the Quick-16S™ NGS Library Prep Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA). Bacterial 16S primers amplified the V3–V4 region of the 16S rRNA gene. These primers were custom-designed by Zymo Research to provide the best coverage of the 16S gene while maintaining high sensitivity. The sequencing library was prepared using an innovative library preparation process in which PCR reactions were performed on real-time PCR machines to control cycles and thereby limit PCR chimera formation. The final PCR products were quantified using qPCR fluorescence readings and pooled at equal molarity. The final pooled library was cleaned using a Select-a-Size DNA Clean & Concentrator™ (Zymo Research, Irvine, CA, USA) and then quantified using a TapeStation® (Agilent Technologies, USA) and Qubit® (Thermo Fisher Scientific, USA).

ZymoBIOMICS® Microbial Community Standard (Zymo Research, USA) was used as a positive control for each DNA extraction performed. ZymoBIOMICS® Microbial Community DNA Standard was used as a positive control for each targeted library preparation. A negative control (i.e., blank extraction control; blank library preparation control) was included to assess the level of bioburden in the wet lab process. The final library was sequenced on an Illumina® MiSeq™ using the v3 reagent kit (600 cycles). Sequencing was performed using a 10% PhiX spike-in.

Unique sequence variants of the amplicon were identified from the raw reads using the DADA2 pipeline algorithm. Potential sequencing errors and chimeric sequences were also removed using the DADA2 pipeline. Taxonomy assignment was performed using Uclust (Universal Clustering) from Qiime v.1.9.1 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) software with the Zymo research database, a 16S database that is created and curated as a reference. Composition visualization was performed using Qiime v.1.9.1 (University of Colorado at Boulder, USA) software.

Quantitative assessment of phosphate solubilization activity

A quantitative assessment of inorganic phosphate solubilization was performed in a modified formulation of liquid NBRIP (National Botanical Research Institute's phosphate growth medium) [202]. Tricalcium phosphate

($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) in the nutrient medium was replaced by natural fossil phosphate rock from Morocco as the sole insoluble phosphate source. Microorganism suspensions were prepared by plating isolates in liquid phase LB medium and incubated at 30 °C, 130 rpm for 16–20 hours before inoculation into this medium. One milliliter of the prepared isolate suspension (or a mixture of two or three isolates of microorganisms in equal proportions; about 1.0×10^7 CFU mL^{-1}) was inoculated into 100 mL of modified NBRIP medium and incubated at 30 °C, 130 rpm for 30 days. As a control, a liquid-modified NBRIP medium without any microorganisms inoculation was prepared. After a 30-day incubation period, the microorganism suspensions were centrifuged in a refrigerated centrifuge at $10,000 \times g$ for 30 minutes to remove insoluble sediment and cell biomass present in the suspensions. Soluble phosphorus (P, mg L^{-1}) in the samples was determined spectrometrically by measuring the optical density at a wavelength of 850 nm ($\text{OD}_{850\text{nm}}$) and using ammonium molybdate ($(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$), which reacts with phosphates and creates a coloured complex. The intensity of the color formed, measured spectrometrically, is directly proportional to the phosphorus concentration in the sample. The phosphorus concentration in the test sample is calculated using calibration curves. The analysis of each sample was performed in triplicate.

Optimization of biological fermentation processes

Optimization of biological fermentation processes was carried out using laboratory bioreactors EDF 5.4_1 (Bioreactors.net AS, Riga, Latvia), with a total volume of up to 5.4 L. The composition of the nutrient medium and growth parameters of the fermentation processes were selected based on the results of experiments on the optimization of the nutrient composition of the nutrient medium and controlled growth parameters.

The laboratory bioreactor vessel was sterilized at 125 °C for 60 minutes and after the autoclaving process was connected to the main bioreactor control unit under aseptic conditions. All controlled fermentation process parameters were set on the bioreactor control screen: stirrer revolutions per minute (rpm), partial oxygen pressure (pO_2), airflow (L/min), temperature (°C), and pH value. Three specially prepared sterile systems with silicone tubing for the bioreactor were used, and these systems contained an alkaline solution (2M NaOH), an acidic solution (2M H_2SO_4), and a silicone-based antifoam Lucrafoam 1573 (LEVACO Chemicals GmbH, Cologne, Germany). The pH value was controlled by two peristaltic pumps, which automatically dosed 2M H_2SO_4 or 2M NaOH solutions directly into the nutrient medium in the bioreactor via silicone tubing. The foam level was recorded by a conductivity

sensor installed in the top cover of the bioreactor vessel. When the maximum foaming level was reached, the assigned peristaltic pump automatically dosed the antifoam until the foam level decreased to an appropriate level. The partial oxygen pressure (pO_2) level was maintained according to a cascade algorithm that operated on two control principles in succession, i.e. firstly, the mixing speed was regulated (from 100 to 800 rpm) and finally the amount of air introduced, the saturation of the nutrient medium with oxygen. During the entire fermentation process, the gas flow was maintained at 2 Standard Liters Per Minute (SLPM). The gas analysis data were calculated automatically by the EDF-5.4_1 system from the consumed gas data.

One of the sterile systems was connected to a peristaltic pump and with its help, sterile nutrient medium and microorganism cell suspension (or a mixture of microorganism cell suspensions in equal parts) were dosed into the bioreactor vessel under aseptic conditions in a laminar flow hood. After the fermentation process was started, water was supplied to the bioreactor jacket in order to maintain the required temperature of the fermentation process.

During the fermentation processes, cell suspension samples were collected every 3 hours of fermentation in order to determine the amount of cell biomass and the change in glucose concentration. Biomass samples were collected aseptically to measure cell concentration or metabolites. Biomass concentration was determined by measuring optical density at 600 nm (OD_{600nm}) using a VR-2000 spectrophotometer (J.P. SELECTA, Barcelona, Spain). Glucose concentration in fermentation samples during fermentation was determined using a 2900 Biochemistry Analyzer (YSI Inc., Weilheim, Germany). A culture medium without cell cultures was used as a control sample in the analyses.

The end of the biological fermentation processes was determined using microscopic analysis with a 3000A-B LED microscope (Comecta, Spain) and by monitoring the changes in the trends of the fermentation process parameters. Fermentation samples were collected in 500 mL sterile jars and stored at 4 °C for further analysis.

Phytohormone analysis using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-TOF/MS)

The sample preparation method was adapted from Castillo et al. [203]. The samples were centrifuged at $13,000 \times g$ for 10 min, and then an aliquot (3 mL) of the supernatant was adjusted to pH 2–3 with 3M HCl. The resulting mixture was extracted with 3 mL of ethyl acetate, shaken for 5 min, and centrifuged at $4200 \times g$ for 5 min. The extraction was repeated three times. The combined

ethyl acetate fraction was evaporated to dryness under a nitrogen stream at 40 °C and dissolved in 1.0 mL of 20% methanol in water containing 0.1% formic acid. The resulting solution was filtered through a 0.45 µm hydrophilic filter and analysed using LC-TOF/MS. The identification and quantification of indole-3-acetic acid, zeatin, gibberellic acid, and abscisic acid were performed using an Agilent 6230 TOF LC/MS system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipped with electrospray ionization (ESI). A Kinetex C18 column (3.0 × 100 mm, 2.6 µm) was used for chromatographic separation at 40 °C. The mobile phase consisted of 0.1% aqueous formic acid (A) and 0.1% formic acid in methanol (B). Gradient elution was performed under the following conditions: 0 min, 10% B; 2 min, 10% B; 3 min, 30% B; 4.5 min, 30% B; 5.5 min, 50% B; 8.5 min, 50% B; 14.5 min, 70% B; 16 min, 98% B; 18 min, 98% B; 19 min, 10% B; and 23 min, 10% B. The flow rate was 0.2 mL min⁻¹, and the injection volume was 20 µL. The mass spectrometer settings were as follows: drying gas flow, 12 L min⁻¹; drying gas temperature, 320 °C; spray pressure, 40 psi; capillary voltage, 3500 V; and fragmentor voltage, 130 V. The ESI-MS was operated in positive ionization mode, and the full scan mass range was 50–1000 *m/z*. Calibration was performed using internal reference masses of 121.0509 *m/z* and 922.0098 *m/z*. Each sample was analysed in triplicate. MassHunter 7.00 software (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) was used to analyse the data. The levels of indole-3-acetic acid, zeatin, gibberellic acid, and abscisic acid in the samples were determined based on the constructed standard curves.

Co-inoculation test under sterile conditions

Plant seeds were obtained from the Agricultural Company “Krekenava”, located in Pusalotos village, Pasvalys district, Panevezys county, Lithuania. The surface of the seeds was disinfected in a 2% NaClO solution for 5 minutes, and then in a 70% ethanol solution for another 5 minutes. Rinsing with sterile H₂O was repeated five times, and the final rinse water was used to assess the quality of disinfection by applying it to agarized nutrient media and after an incubation period of 48 hours at 30 °C, the number of colony-forming units was assessed. Pre-selected, disinfected, healthy, and similar-sized seeds were planted in plastic pots (volume = 2.5 L) containing two kilograms of a mixture of unsterilized soil, vermiculite, peat substrate, and perlite (ratio: 5:1:1:1 *w/v*). One milliliter of cell suspension was added to each test pot 7 days after seeding. For the general inoculation procedure, a mixture of cell suspensions consisting of two or three microorganisms in a ratio of 1:1 or 1:1:1 was prepared. The control was 1 mL of liquid nutrient medium in which the

microorganisms were incubated. After 14 days, the bacterial suspensions were re-infected under the same conditions as before. Each test variant consisted of five replicates.

The plants were grown at 28 °C temperature, about 70% humidity with a 16:8 day and night photoperiod in a laboratory plant growth chamber (NADE RGQ-360N) for about 55 days. The pots with plants were regularly watered with tap water to simulate field conditions. After 55 days of vegetation, plant parameters were measured, including root and shoot length and leaf number; root and shoot fresh weight; and dry weight of roots and shoots (dried at 70 °C for 48 hours).

Statistical analysis

All experiments were performed in at least three replicates. Before statistical comparisons, data were assessed for normality using the Shapiro–Wilk test and for equality of variance using the Levene test. Both assumptions were met. One-way ANOVA was used to calculate data variance, and means were calculated based on the Tukey test ($p \leq 0.05$) using GraphPad Prism 10.4.1 software (GraphPad Software Inc., California, USA).

RESULTS

Analysis of experimental areas

Three agricultural fields were selected in Panevezys, Pusalotas district, Krekenava, where the same crop rotation and tillage technology was applied. Specific names were given to each cultivated land area and abbreviations of these names were created: Jakuboniai (JAK), Beicarke (BEI), and Deglenai (DEG). A general survey of these agricultural fields was carried out, which indicated the geographical coordinates of the fields and the height above sea level. The climate of the experimental areas according to the Köppen-Geiger climate classification system was assigned to the *Dfb* type, which is characterized by a warm-summer mid-latitude climate. General survey data are presented in **Table 2**.

Table 2. Geographic coordinates, altitude, and climatic characteristics of agricultural fields.

Agricultural area	Coordinates ¹	Altitude (m) ²	Climate type ³
JAK	55°54'00.3" N 24°06'44.3" E	54	<i>Dfb</i>
BEI	55°55'53.6" N 24°16'46.2" E	41	
DEG	55°56'17.8" N 24°08'26.9" E	48	

¹Latitude, longitude; ²above sea level; ³according to the *Köppen-Geiger* classification.

For the agrochemical characterization of soil samples, composite soil samples from the 0–20 cm depth of the soil layer were taken (min. 7 soil samples from different locations in one field) and mixed together to obtain one complex soil sample for each agricultural field. Information on the results of agrochemical analysis of each agricultural field is presented in **Table 3**.

Table 3. Agrochemical properties of composite soil samples (0–20 cm).

Area	Depth (cm)	pH value	Organic carbon %	P ₂ O ₅	K ₂ O	N-NO ₃ mg Kg ⁻¹	N-NH ₄	N _{min}
JAK	0–20	7.08	1.19	115	129	1.43	2.35	3.77
BEI		6.11	0.95	199	141	8.32	0.74	9.06
DEG		8.00	2.12	159	265	15.20	0.50	15.70

In the composite soil samples, it was determined that the pH of the soil of the first agricultural field (JAK) was close to neutral, i.e. 7.08. Meanwhile, the soil of the second agricultural field (BEI) was close to weakly acidic soils, with a pH of 6.11, and the pH of the soil of the third agricultural field (DEG) was classified as weakly alkaline soils and its pH value reached 8.00 [198].

When comparing the amounts of organic carbon (C_{org}) in agricultural soils, it was determined that the lowest concentration of organic carbon was found in the BEI soil – 0.95%, which indicates soil, that is classified as low organic carbon soils (less than 1%). The C_{org} values determined in JAK and DEG soils were 1.19 and 2.12%, respectively, which indicated that the soils are classified as medium-concentration soils, in which the C_{org} value ranges from 1.0% to 3.0% [205].

The next agrochemical indicator analysed was the content of P₂O₅ in the soils: 115 mg Kg⁻¹ was determined in JAK soil; 199 mg Kg⁻¹ in the BEI soil sample and 159 mg Kg⁻¹ in DEG soil. According to the literature analysis, the best phosphorus uptake (100%) is when the soil pH is neutral (7.0), while when the soil pH varies from 6.0 to 6.5, phosphorus uptake varies from 52% to 95%, and at a soil pH value of 7.5 and below, phosphorus uptake drops from 70% to 20%. When determining the concentration of P₂O₅ in the selected soils, it was determined that the agricultural field JAK, according to the assessment groups in agricultural land, belongs to group III, which includes soils with an average phosphorus concentration in mineral soils (from 101 to 150 mg Kg⁻¹), while the other two soils, BEI and JAK, belonged to group IV, whose average phosphorus concentration in mineral soils ranges from 151 to 200 mg Kg⁻¹. Soils with a high phosphorus content are found in Panevėžys municipality – 53.7% [206].

When analysing the concentrations of K_2O in agricultural field soils, it was found that the JAK soil sample has the lowest concentration – 129 mg Kg^{-1} , while the concentrations determined in the BEI and DEG soil samples reached 141 and 265 mg Kg^{-1} , respectively. Based on the assessment of the concentration of free potassium in mineral soils, the JAK and BEI soils belong to group III, in which the concentration of K_2O varies from 101 to 150 mg Kg^{-1} , while the DEG soil belongs to group V, which includes soils with very high K_2O concentrations (from 201 to 300 mg Kg^{-1}). The determined parameters of both free P and K_2O are characteristic of the Central Lithuanian lowlands [207].

Nitrate nitrogen ($N-NO_3$, mg Kg^{-1}) in soil is one of the most important forms of nitrogen for plants. Its concentration in the studied agricultural fields differed significantly from each other: JAK – 1.43 mg Kg^{-1} , BEI – 8.32 mg Kg^{-1} , and DEG – 15.20 mg Kg^{-1} . Soils with less than 10 mg Kg^{-1} $N-NO_3$ belong to low-concentration soils, where nitrogen is limited or nitrates are quickly leached from the soil, and in this case, JAK and BEI soils were assigned to this group, but DEG soil had the highest $N-NO_3$ concentration and was assigned to medium-concentration soils, where $N-NO_3$ concentration ranges from 10 to 30 mg Kg^{-1} . Ammonium nitrate ($N-NH_4$) is another form of nitrogen that can be absorbed by plants, but compared to $N-NO_3$ it is less mobile. Low $N-NH_4$ content was found in all tested soils and all three soils were assigned to the low $N-NH_4$ concentration group (less than 5 mg Kg^{-1}): The concentrations determined in JAK, BEI, and DEG soils were 2.35, 0.74, and 0.50 mg Kg^{-1} , respectively. Mineral nitrogen (N_{min}) in the soil includes all forms of nitrogen that are available to plants, i.e., nitrate nitrogen ($N-NO_3$) and nitrate ammonium ($N-NH_4$). The first two analysed soils, JAK and BEI, were classified as low N_{min} concentration group (less than 10 mg Kg^{-1}): 3.77 and 9.06 mg Kg^{-1} , respectively, while the third tested soil, DEG, was classified as medium N_{min} concentration group (from 10 to 30 mg Kg^{-1}) and reached 15.70 mg Kg^{-1} [208].

Microorganisms isolation, molecular identification, and phylogenetic analysis

In 2020, *Z. mays* culture was grown in all three agricultural fields. In the complex rhizosphere soil sample from the JAK cultivated land area, 92 microorganisms with different morphology were isolated. In parallel, 120 and 113 morphologically different microorganisms were isolated from the complex rhizosphere soil samples of *Z. mays* grown in the BEI and DEG agricultural fields, respectively. In all of 2020, 325 microorganisms were

isolated from all three agricultural areas and the rhizosphere soils of common corn grown in them. In the following year 2021, *P. vulgaris* was cultivated in the agricultural fields of JAK, BEI, and DEG. 101 morphologically distinct microorganisms were isolated from the complex rhizosphere soil sample of these cultivated plant cultures, which was collected from the JAK field, and 112 and 108 morphologically distinct microorganisms were isolated from the complex rhizosphere soil samples of BEI and DEG, respectively. In total, in 2021, 321 morphologically distinct microorganisms were isolated from the rhizosphere of *P. vulgaris* culture grown in all agricultural areas. In the last study year 2022, 104, 105, and 100 morphologically distinct microorganisms were isolated from the rhizosphere soil samples of JAK, BEI, and DEG agricultural lands and the *T. aestivum* cultivated in them, respectively, and the total number of morphologically distinct microorganisms reached 309 (**Table 4**).

Table 4. Total number of isolated microorganisms during the study (2020–2022).

Time of soil sample collection	2020 year (<i>Z. mays</i>)			2021 year (<i>P. vulgaris</i>)			2022 year (<i>T. aestivum</i>)		
Location	JAK	BEI	DEG	JAK	BEI	DEG	JAK	BEI	DEG
Total number of isolated microorganisms	92	120	113	101	112	108	104	105	100
	Total: 325			Total: 321			Total: 309		

Nine different isolated microorganisms were selected in each year of the study, i.e. three isolates from each agricultural land (three agricultural lands × three isolates microorganisms = nine different isolated microorganisms). The most important aspect during the selection of microorganisms was to isolate three different genera of microorganisms from the same agricultural land.

The first study group consisted of isolates of the genera *Bacillus* (*Priestia*) spp., *Pseudomonas* spp., and *Rhodococcus* spp. During phylogenetic analysis, isolates IJAK92, IIBEI11 and IIIDEG4 were compared with other typical species of the genera *Bacillus* and *Priestia* and it was found that the strains are closest to *Bacillus altitudinis* 41KF2b, *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 and *Priestia aryabhattai* B8W22, respectively (**Fig. 1A**). In order to determine the phylogenetic position of *Pseudomonas* spp. Isolates IJAK41, IIBEI19 and IIIDEG59 strains among other species of the genus *Pseudomonas*, a phylogenetic tree was constructed using other typical species of the genus *Pseudomonas* and it was found that the isolates are closest to *Pseudomonas thivervalensis* DSM 13194, *Pseudomonas laurylsulfatiphila* AP3_16, *Pseudomonas laurylsulfativorans* AP3_22, respectively (**Fig. 1B**). The results

of the phylogenetic analysis showed that isolates IJAK17, IIBEI38 and IIIDEG40 belong to the genus *Rhodococcus* and when comparing them with the typical species of the genus *Rhodococcus*, isolate IJAK17 showed the highest similarity to the typical species *Rhodococcus qingshengii* JCM 15477, while isolates IIBEI38 and IIIDEG40 had the highest similarity to the typical species *Rhodococcus erythropolis* NBRC 15567 (**Fig. 1C**).

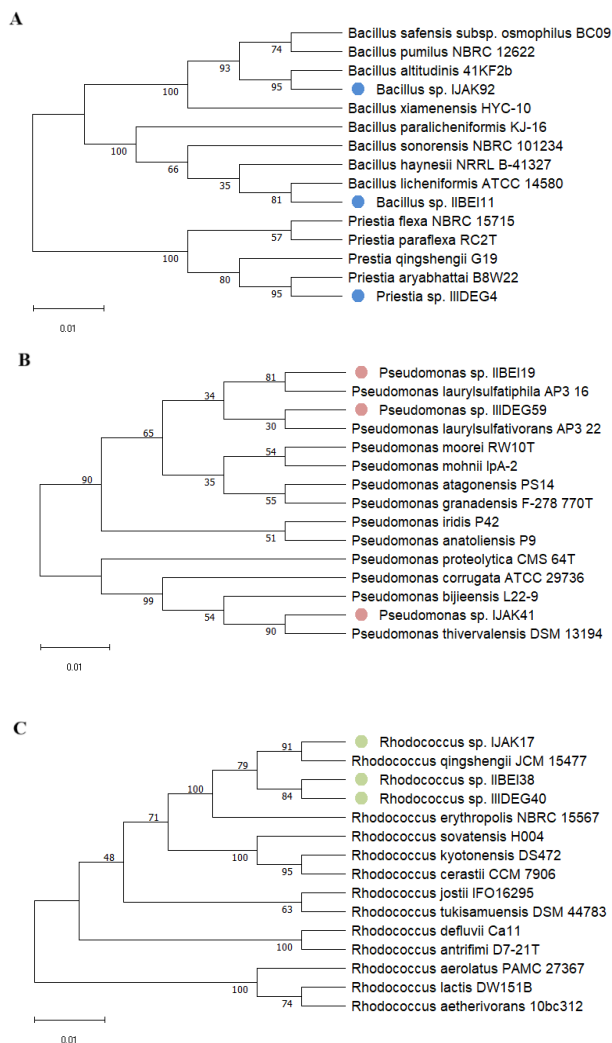


Fig. 1. Phylogenetic positions of the first research group (2020) of three different genera: *Bacillus* (*Priestia*) spp. isolates *Bacillus* sp. IJAK92, *Bacillus* sp. IIBEI11 and *Priestia* sp. IIIDEG4 (**A**); *Pseudomonas* spp. isolates *Pseudomonas* sp. IJAK41, *Pseudomonas* sp. IIBEI19 and *Pseudomonas* sp. IIIDEG59 (**B**); and *Rhodococcus* spp. Isolates *Rhodococcus* sp. IJAK17, *Rhodococcus* sp. IIBEI38 and *Rhodococcus* sp. IIIDEG40 (**C**). Evolutionary relationships were established using the Neighbor-Joining method. The dash indicates 0.01 nucleotide changes at one position. Evolutionary analysis was performed using MEGA11 software.

In the second study group, the analysis of the phylogenetic tree results confirmed that isolates IJAK2, IIBEI80, and IIIDE9 belonged to the genus *Pararhizobium* bacteria and all three isolates were closest to the species *Pararhizobium giardinii* H152 (**Fig. 2A**). It was also confirmed that isolates IJAK19, IIBEI61 and IIIDE936 belonged to the genus *Paenibacillus*, and in more detail, isolate IJAK19 was closest to *Paenibacillus xylanexedens* B22a, isolate IIBEI61 to *Paenibacillus amylolyticus* NBRC 15957, and isolate IIIDE936 to *Paenibacillus farraposensis* UY79 (**Fig. 2B**).

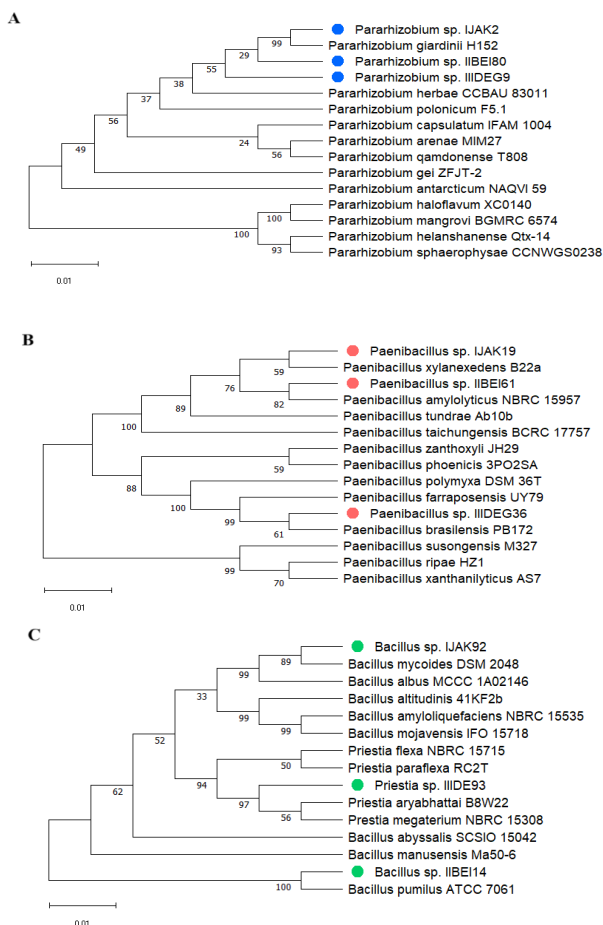


Fig. 2. Phylogenetic position of three different genera of the second study group: *Pararhizobium* spp. isolates *Pararhizobium* sp. IJAK2, *Pararhizobium* sp. IIBEI80 and *Pararhizobium* sp. IIIDE936 (**A**); *Paenibacillus* spp. isolates *Paenibacillus* sp. IJAK19, *Paenibacillus* sp. IIBEI61 and *Paenibacillus* sp. IIIDE936 (**B**); and *Bacillus* (*Priestia*) spp. isolates *Bacillus* sp. IJAK92, *Bacillus* sp. IIBEI14 and *Priestia* sp. IIIDE93 (**C**). Evolutionary relationships were established using the Neighbor-Joining method. The dash indicates 0.01 nucleotide changes at one position. Evolutionary analysis was performed using MEGA11 software.

The remaining isolates of the second study group, IJAK94, IIBEI14 and IIIDEG93, after phylogenetic analysis, confirmed that the isolated strains belonged to the genera *Bacillus* or *Priestia* bacteria. Isolate IJAK94 was closest to *Bacillus mycoides* DSM 2048, isolate IIBEI14 was closest to *Bacillus pumilus* ATCC 7061, and isolate IIIDEG93 was closest to *Priestia megaterium* NBRC 15308 (**Fig. 2C**).

In the third and final group of studies, a phylogenetic tree was constructed using representative strains of *Bacillus* and *Priestia* to determine the phylogenetic position of *Bacillus toyonensis* IJAK27, *Priestia aryabhattai* IIBEI32, and *Bacillus tequilensis* IIIDEG45 among other *Bacillus* and *Priestia* species. Analysis of the results of the constructed phylogenetic tree confirmed that strains IJAK27, IIBEI32, and IIIDEG45 belonged to the genus *Bacillus* and showed the highest similarity to the typical species *Bacillus toyonensis* CNCM I-1012/NCIB 40112, *Priestia aryabhattai* B8W22 and *Bacillus tequilensis* NIO-Zn4, respectively (**Fig. 3A**). In order to determine the evolutionary relationships of *Pseudomonas bijieensis* IJAK44, *Pseudomonas helmanticensis* IIBEI40, and *Pseudomonas granadensis* IIIDEG41 isolates among other typical species of the genus *Pseudomonas*, the phylogenetic tree was constructed and it was found that isolates IJAK44, IIBEI40 and IIIDEG41 belonged to the genus *Pseudomonas* and showed the highest similarity to the typical species *Pseudomonas bijieensis* L22-9, *Pseudomonas helmanticensis* OHA11 and *Pseudomonas granadensis* F-278, 770T, respectively (**Fig. 3B**). Phylogenetic analysis of the isolated microorganisms *Streptomyces gardneri* IJAK91, *Streptomyces anulatus* IIBEI22 and *Streptomyces badius* IIIDEG72 revealed that these isolated microorganisms belong to the genus *Streptomyces* and when compared with typical species of the genus *Streptomyces*, strains IJAK91, IIBEI22 and IIIDEG72 showed the highest similarity to the typical species *Streptomyces gardneri* NBRC 3385, *Streptomyces anulatus* NBRC 13369 and *Streptomyces badius* NBRC 12745, respectively (**Fig. 3C**).

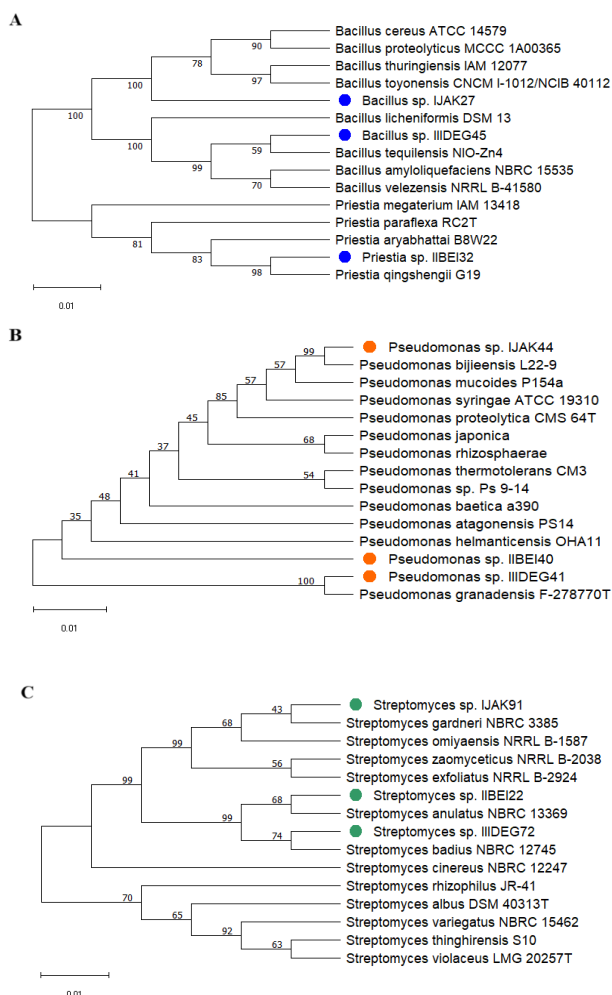


Fig. 3. Phylogenetic position of three different genera of the third study group: *Bacillus* (*Priestia*) spp. isolates *Bacillus* sp. IJAK27, *Priestia* sp. IIBEI32 and *Bacillus* sp. IIIDEG45 (A); *Pseudomonas* spp. isolates *Pseudomonas* sp. IJAK44, *Pseudomonas* sp. IIBEI40 and *Pseudomonas* sp. IIIDEG41 (B); and *Streptomyces* spp. isolates *Streptomyces* sp. IJAK91, *Streptomyces* sp. IIBEI22 and *Streptomyces* sp. IIIDEG72 (C). Evolutionary relationships were established using the Neighbor-Joining method. The dash indicates 0.01 nucleotide changes at one position. Evolutionary analysis was performed using MEGA11 software.

Analysis of bacterial microbiota composition in rhizosphere soil samples

According to the biological classification of living organisms, a total of 20 different taxa were identified in the bacterial at the phyla level in each of the 9 analysed rhizosphere soil samples. *Actinomycetota*, *Pseudomonadota*, *Bacillota*, *Chloroflexota* and *Acidobacteriota* were the five most abundant

bacterial phyla in terms of relative abundance in all analysed rhizosphere soil samples. Their relative abundance in rhizosphere soil samples ranged from 32.2–47.9%, 20.7–25.1%, 8.7–12.8%, 7.4–9.1%, and 3.0–8.4%, respectively.

In the first year of the study (2020), *Actinomycetota* was found to be the most dominant bacterial phylum in the analysed *Z. mays* rhizosphere soil samples IJAK (38.6%), IIBEI (40.8%), and IIIDEG (43.3%). *Pseudomonadota* was the next most abundant bacterial phylum in the rhizosphere soils IJAK (24.7%), IIBEI (24.6%), and IIIDEG (23.3%). Although *Bacillota* was in third place in relative abundance, this phylum also dominated in the soils IJAK (12.8%), IIBEI (8.7%) and IIIDEG (10.3%). The relative abundance of the phylum *Chloroflexota* reached IJAK (8.5%), IIBEI (8.6%), and IIIDEG (9.1%). The last of the five most dominant bacterial phyla was *Acidobacteriota* and accounted for IJAK (3.6%), IIBEI (7.0%), and IIIDEG (3.4%) relative abundance in the analysed samples. Unidentified and unclassified bacteria accounted for 2.8%, 1.5%, and 2.4% of the relative abundance in the IJAK, IIBEI, and IIIDEG rhizosphere soil samples, respectively. The composition of the remaining bacterial phyla in the IJAK, IIBEI, and IIIDEG rhizosphere soil samples was distributed at 9.0%, 8.8%, and 8.2% of the remaining total relative abundance (100%).

In the second year of the study (2021), the most dominant bacterial phylum in the *P. vulgaris* rhizosphere soil samples was also *Actinomycetota* IJAK (47.9%), IIBEI (39.8%), and IIIDEG (42.3%). In the second place, the *Pseudomonadota* phylum dominated in terms of relative abundance in the IJAK (20.7%), IIBEI (24.9%), and IIIDEG (25.0%) soil samples. *Bacillota* were the third most abundant phylum in IJAK (8.9%), IIBEI (9.6%), and IIIDEG (9.4%) samples, while the phylum *Chloroflexota* was similar in relative abundance to *Bacillota*: IJAK (8.2%), IIBEI (7.8%) and IIIDEG (9.1%). The fifth most abundant phylum in IJAK (3.8%), IIBEI (5.8%) and IIIDEG (3.0%) rhizosphere soil samples was *Acidobacteriota*. Unknown and unclassified bacteria accounted for 3.9%, 4.1% and 2.7% of the total relative abundance in IJAK, IIBEI and IIIDEG rhizosphere soil samples, respectively. The composition of the remaining bacterial phyla in the rhizosphere soil samples IJAK, IIBEI and IIIDEG was distributed at 6.6%, 8.0% and 8.5% of the remaining total relative abundance (100%), respectively.

In the third year of the study (2022), based on the taxonomy classification of living organisms, *Actinomycetota* was the most dominant bacterial phylum of IJAK (32.2%), IIBEI (39.9%) and IIIDEG (39.4%) in the rhizosphere soil samples of *T. aestivum*. The second most dominant bacterial phylum was *Pseudomonadota* IJAK (25.1%), IIBEI (22.8%) and IIIDEG (23.6%). *Bacillota* was in third place in relative abundance in the rhizosphere soil

samples IJAK (11.9%), IIBEI (9.0%) and IIIDEG (9.8%). The phylum *Chloroflexota* of the bacteria was the fourth most dominant phylum in the samples IJAK (6.9%), IIBEI (8.4%) and IIIDEG (7.6%). Meanwhile, the phylum *Acidobacteriota* represented the lowest relative abundance of the five most dominant phyla: IJAK (4.2%), IIBEI (7.4%) and IIIDEG (5.4%). Unknown and unclassified bacteria represented 4.4%, 4.2% and 4.7% of the relative abundance in the rhizosphere soil samples IJAK, IIBEI and IIIDEG, respectively. The composition of the remaining bacteria phyla in the rhizosphere soil samples IJAK, IIBEI and IIIDEG accounted for 15.3%, 8.3% and 9.5% of the remaining total relative abundance (100%) respectively (Figure 4).

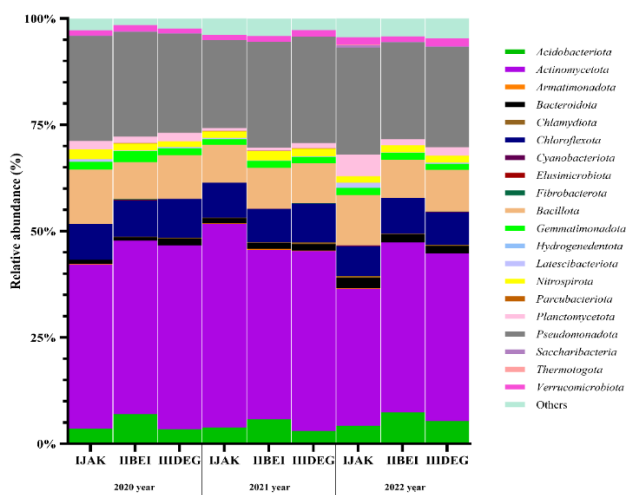


Fig. 4. Relative abundance of bacterial phyla in the studied rhizosphere soil samples (2020–2022). Each column represents one rhizosphere soil sample, and different colors in the columns represent different bacterial phyla.

According to the obtained results of the study, those phyla of the bacteria to which the microorganisms isolated in this scientific study belonged were selected for further and more detailed microbiota analysis. It was determined that all isolated microorganisms belonged to the *Actinomycetota*, *Pseudomonadota* and *Bacillota* bacterial phyla, which were also the three most dominant bacterial phyla in the studied rhizosphere soil samples.

Phosphorus in liquid NBRIP medium with rock phosphate and organic acid analysis

In the first study group of 2020, the ability of microorganisms *Bacillus* sp. IJAK92, *Pseudomonas* sp. IJAK41 and *Rhodococcus* sp. IJAK17 IIBEI38

(only strain numbers are used in the analysis below) to dissolve sedimentary rock, i.e. phosphorite from Morocco, ranged from 9.06 to 84.21 mg L⁻¹. One milliliter of the prepared isolate suspension (or a mixture of two or three isolates of microorganisms in equal parts) was added to each test variant with modified NBRIP nutrient medium containing MF. Seven different test variants were created: IJAK92, IJAK41, IJAK17, IJAK92 + IJAK41, IJAK92 + IJAK17, IJAK41 + IJAK17 and IJAK92 + IJAK41 + IJAK17. It was found that after a 30-day incubation period, the test variant IJAK92 + IJAK41 showed the highest soluble phosphorus concentration in the nutrient medium (84.21 mg L⁻¹). A slightly lower soluble P concentration was shown by the mixture of three microorganisms IJAK92 + IJAK41 + IJAK17 (79.89 mg L⁻¹). However, no significant difference in P concentrations was observed between the variants IJAK41 (42.11 mg L⁻¹) and IJAK41 + IJAK17 (41.76 mg L⁻¹) and between the variants IJAK92 (37.68 mg L⁻¹) and IJAK92 + IJAK17 (34.42 mg L⁻¹), and the lowest soluble P concentration was detected in the variant IJAK17 (9.06 mg L⁻¹) (**Figure 5A**).

In the second group of studies in 2020, *Bacillus* sp. IIBEI11, *Pseudomonas* sp. IIBEI19, *Rhodococcus* sp. IIBEI38 (only strain numbers are used in the analysis below) consisted of variants of the IIBEI11, IIBEI19, IIBEI38, IIBEI11 + IIBEI19, IIBEI11 + IIBEI38, IIBEI19 + IIBEI38 and IIBEI11 + IIBEI19 + IIBEI38 experiment, and the dissolved P concentration in the samples of these experiments ranged from 5.45 to 75.60 mg L⁻¹. It was found that the highest soluble P concentration was detected in variant IIBEI11+IIBEI19 (75.60 mg L⁻¹). The next concentration determined was IIBEI11+IIBEI19+IIBEI38 (54.90 mg L⁻¹), followed by variants IIBEI19 (49.10 mg L⁻¹), IIBEI11 (44.43 mg L⁻¹), IIBEI11+IIBEI38 (32.73 mg L⁻¹), IIBEI19+IIBEI38 (15.75 mg L⁻¹) and IIBEI38 (5.45 mg L⁻¹) (**Figure 5B**).

The microorganisms of the third 2020 study group *Priestia* sp. IIIDEG4, *Pseudomonas* sp. IIIDEG59, *Rhodococcus* sp. IIIDEG40 (only strain numbers are used in the analysis below) comprised the next seven experimental variants: IIIDEG4, IIIDEG59, IIIDEG40, IIIDEG4+IIIDEG59, IIIDEG4 + IIIDEG40, IIIDEG59 + IIIDEG40 and IIIDEG4 + IIIDEG59 + IIIDEG40. The range of dissolved P concentration in the samples of these variants was dominated by 5.50 to 94.20 mg L⁻¹. The highest P concentration was detected in variant IIIDEG4 (94.20 mg L⁻¹), and all other test variants are listed in decreasing order: IIIDEG4 + IIIDEG59 + IIIDEG40 (63.70 mg L⁻¹) and IIIDEG4 + IIIDEG59 (61.98 mg L⁻¹), IIIDEG4 + IIIDEG40 (56.40 mg L⁻¹), IIIDEG59 + IIIDEG40 (46.78 mg L⁻¹) and IIIDEG59 (46.60 mg L⁻¹), IIIDEG40 (5.50 mg L⁻¹) (**Fig. 5C**). In all study groups, control (culture medium without any cell inoculation) was used as sample 8.

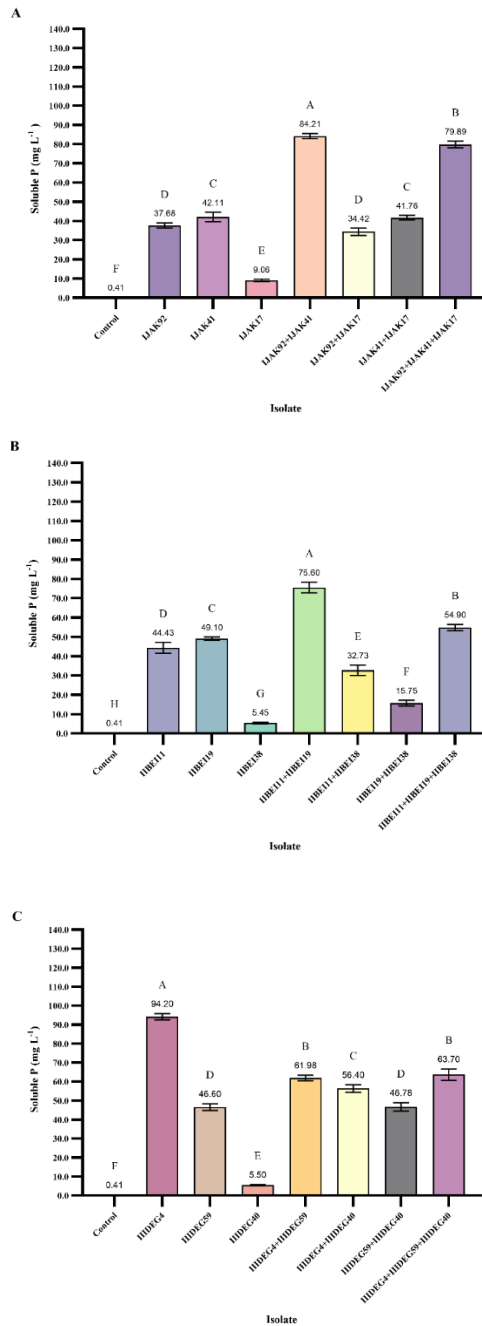


Fig. 5. Effect of single, double and triple inoculation of group I isolates on MF dissolution in modified NBRIP liquid medium (A–C). The differences between the mean dissolution capacities in the culture medium are statistically significant by one-way ANOVA ($p < 0.05$). Vertical bars indicate the error bars at the 95% confidence level ($n = 3$). The same letters indicate that differences between means are not statistically significant (Tukey HSD post hoc test).

In the first study group of 2021, the ability of microorganisms *Pararhizobium* sp. IJAK2, *Paenibacillus* sp. IAJK19 and *Bacillus* sp. IJAK94 (hereinafter only strain numbers are used in the analysis) to dissolve sedimentary rock, i.e. phosphorite from Morocco, ranged from 4.61 to 93.38 mg L⁻¹. The best result was shown by the joint inoculation of IJAK2 + IJAK19 + IJAK94 (93.38 mg L⁻¹). A single inoculation with IJAK94 also showed a good result in P dissolution (65.67 mg L⁻¹). Meanwhile, no significant differences in P concentration were observed between the joint inoculation with the IJAK2 + IJAK94 mixture and the joint inoculation with the IJAK19 + IJAK94 mixture (46.33 and 44.51 mg L⁻¹, respectively). Also, no significant differences were observed between the co-inoculation of IJAK2 + IJAK19 and the single inoculation with IJAK19 (16.92 and 15.00 mg L⁻¹, respectively). The lowest P concentration was found with the single inoculation of IJAK2 (4.61 mg L⁻¹) (**Fig. 6A**).

In the second study group, the soluble P concentration of isolates *Pararhizobium* sp. IIBEI80, *Paenibacillus* sp. IIBEI61 and *Bacillus* sp. IIBEI14 (only strain numbers are used in the analysis below) ranged from 5.55 to 85.75 mg L⁻¹. The highest soluble P concentration was detected in the sample, which used a joint inoculation of three microorganisms IIBEI80 + IIBEI61 + IIBEI14 (85.75 mg L⁻¹). Joint inoculation with IIBEI61 and IIBEI14 also showed good MF solubilization results - the soluble P concentration in the sample reached 80.80 mg L⁻¹. No significant difference in concentration was observed between the two variants: co-inoculation IIBEI80+IIBEI14 (50.78 mg L⁻¹) and single inoculation with IIBEI14 (49.98 mg L⁻¹). Also, no significant difference was observed between co-inoculation IIBEI80 + IIBEI61 (25.13 mg L⁻¹) and single inoculation with IIBEI61 (24.35 mg L⁻¹). The lowest P concentration was determined with single inoculation of IIBEI80 (5.55 mg L⁻¹) (**Fig. 6B**).

In the third group of microorganisms, *Pararhizobium* sp. IIIDEG9, *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 and *Priestia* sp. IIIDEG93 (only strain numbers are used in the analysis below), the range of soluble P was from 5.18 to 98.18 mg L⁻¹. The highest P concentration was found in the double inoculation variant IIIDEG36 + IIIDEG93 (98,18 mg L⁻¹). The next sample with a soluble P concentration of 62,98 mg L⁻¹ was the combined inoculation IIIDEG9 + IIIDEG36 + IIIDEG93. A single inoculation of IIIDEG93 gave a soluble P concentration of 50,75 mg L⁻¹. Three samples did not show a significant difference in soluble P concentration: IIIDEG9 + IIIDEG36, IIIDEG9 + IIIDEG93 and single inoculation with IIIDEG36 (41.08, 40.53 and 38.88 mg L⁻¹, respectively). The lowest P concentrations were found in the single inoculation with IIIDEG9 (5.18 mg L⁻¹) (**Fig. 6C**).

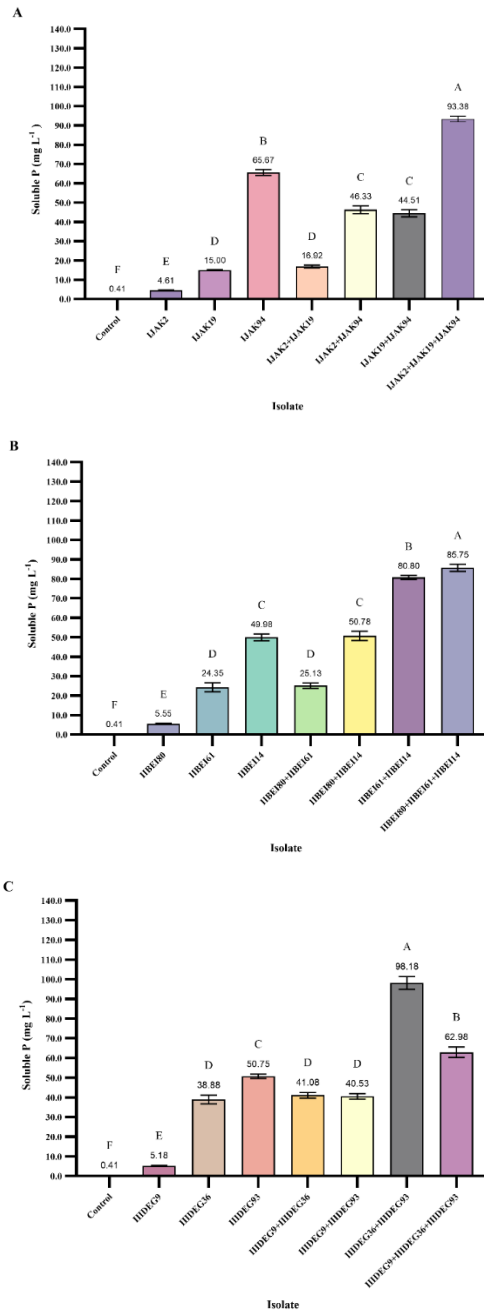


Fig. 6. Effect of single, double and triple inoculations of group II isolates on the dissolution of MF in modified NBRIP liquid medium (A–C). The differences between the mean dissolution abilities in culture medium are statistically significant by one-way ANOVA ($p < 0.05$). Vertical bars indicate the error bars at the 95% confidence level ($n = 3$). The same letters indicate that differences between means are not statistically significant (Tukey HSD post hoc test).

The ability of the first 2022 study group isolates *Bacillus* sp. IJAK27, *Pseudomonas* sp. IJAK44 and *Streptomyces* sp. IJAK91 (only strain numbers are used in the analysis below) to solubilize MF ranged from 16.45 to 129.17 mg L⁻¹. The joint coinoculation of all three microorganisms IJAK27 + IJAK44 + IJAK91 showed the highest soluble P concentration in the NBRIP nutrient medium after a 30-day incubation period (129.17 mg L⁻¹). The joint inoculation of IJAK27 + IJAK44 and IJAK44 + IJAK91 also showed a high P solubilization ability in the liquid NBRIP medium: 60.83 mg L⁻¹ and 55.72 mg L⁻¹, respectively. On the other hand, the single inoculation of IJAK44 showed better phosphate solubilization results (37.33 mg L⁻¹) than the combined inoculation of IJAK27 + IJAK91 (29.33 mg L⁻¹). Finally, the single inoculation of IJAK27 and the single inoculation of IJAK91 showed statistically lower P solubilization capacity compared to the other test variants: 20.22 mg L⁻¹ and 16.45 mg L⁻¹, respectively (**Fig. 7A**).

In the second group of 2022, three isolates *Priestia* sp. IIBEI32, *Pseudomonas* sp. IIBEI40 and *Streptomyces* sp. IIBEI22 (only strain numbers are used in the analysis below) showed different P solubilization capacities compared to the first group. The MF solubilization in liquid NBRIP medium ranged from 5.80 to 90.95 mg L⁻¹. Variant IIBEI32 + IIBEI40 showed maximum P solubilization potential (90.95 mg L⁻¹), while the other two coinoculations with IIBEI32 + IIBEI40 + IIBEI22 and IIBEI40 + IIBEI22 also showed significant P solubilization results, although no statistically significant differences were found between the two study variants (45.55 mg L⁻¹ and 44.18 mg L⁻¹, respectively). Single inoculation of IIBEI40 had significantly higher P solubilization potential (34.60 mg L⁻¹) than the remaining inoculations of IIBEI32 + IIBEI22, IIBEI32 and IIBEI22. Variants with IIBEI32 + IIBEI22 coinoculation and single inoculation of IIBEI32 showed low P solubilization potential and insignificant difference in concentration (14.68 mg L⁻¹ and 14.53 mg L⁻¹, respectively). In contrast, the treatment with a single inoculation of IIBEI22 had the lowest MF (5.80 mg L⁻¹) solubilization potential, indicating that IIBEI22 cannot be used as a P-solubilizing microorganism unless it is co-inoculated with other microorganisms that have a synergistic effect (**Fig. 7B**).

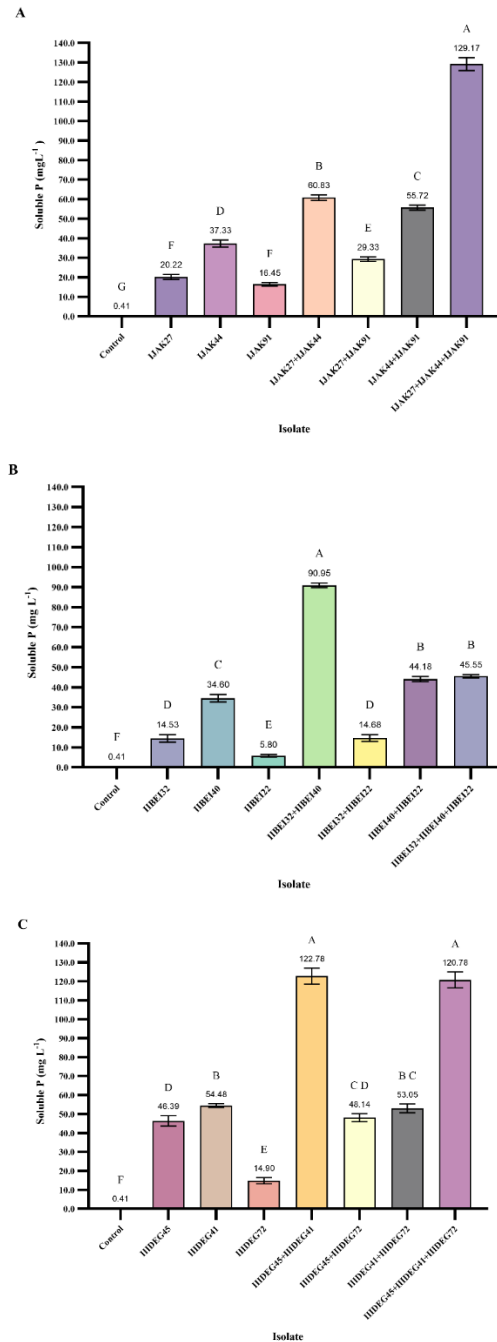


Fig. 7. Effect of single, double and triple inoculation of group III isolates on MF dissolution in modified NBRIP liquid medium (A–C). The differences between the mean dissolution abilities in the culture medium are statistically significant by one-way ANOVA ($p < 0.05$). Vertical bars indicate the error bars at the 95% confidence level ($n = 3$). The same letters indicate that differences between means are not statistically significant (Tukey HSD post hoc test).

In the last group of 2022, the soluble P concentrations of *Bacillus* sp. IIIDEG45, *Pseudomonas* sp. IIIDEG41 and *Streptomyces* sp. IIIDEG72 (only strain numbers are used in the analysis below) ranged from 14.90 to 122.78 mg L⁻¹. In this experimental group, the best results were achieved using two coinoculation options – IIIDEG45 + IIIDEG41 and IIIDEG45 + IIIDEG41 + IIIDEG72 (122.78 mg L⁻¹ and 120.78 mg L⁻¹, respectively). Single inoculation of IIIDEG41 and co-inoculation of IIIDEG41 + IIIDEG72 showed insignificant difference between them (54.48 mg L⁻¹ and 53.05 mg L⁻¹, respectively). However, co-inoculation of IIIDEG41 + IIIDEG72 also showed insignificant difference compared to co-inoculation of IIIDEG45 + IIIDEG72 (48.14 mg L⁻¹). On the other hand, no difference was observed between co-inoculation with IIIDEG45 + IIIDEG72 and single inoculation with IIIDEG45 (46.39 mg L⁻¹), and IIIDEG72 showed statistically the lowest ability in P solubilization (14.90 mg L⁻¹) (**Fig. 7C**).

According to the results of the 2020–2022 study, one (or two variants that did not show a significant difference) was selected from each study year and each study group for more detailed and comprehensive studies, which indicated the best results in P dissolution. Three variants were selected from the 2020 study: IJAK92 + IJAK41 (84.21 mg L⁻¹), IIBEI11 + IIBEI19 (75.60 mg L⁻¹) and IIIDEG4 (94.20 mg L⁻¹); three variants were selected from 2021: IJAK2 + IJAK19 + IJAK94 (93.38 mg L⁻¹), IIBEI80 + IIBEI61 + IIBEI14 (85.75 mg L⁻¹) and IIIDEG9 + IIIDEG36 + IIIDEG93 (98.18 L⁻¹); from 2022 four variants were selected: IJAK27 + IJAK44 + IJAK91 (129.17 mg L⁻¹), IIBEI32 + IIBEI40 (90.95 mg L⁻¹), IIIDEG45 + IIIDEG41 (122.78 mg L⁻¹) and IIIDEG45 + IIIDEG41 + IIIDEG72 (120.78 mg L⁻¹).

Optimization of nutrient medium composition and growth conditions in laboratory-scale EDF 5.4_1 bioreactors

After determining the most suitable components of the nutrient medium and optimal growth conditions for the strains *Priestia* sp. IIIDEG4, *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 + *Priestia* sp. IIIDEG93 and *Bacillus* sp. IJAK27+ *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91, further analyses were performed using fermentation processes in 5.4 L laboratory volume bioreactors (EDF 5.4_1). At the beginning of the fermentation process, the required inoculum of the test culture was dosed into the bioreactors (the concentration of the inoculated cell suspensions (about 1.0×10^7 CFU mL⁻¹). At the beginning of the fermentation processes (up to approximately 3–5 hours), a latent (*lag*) phase of bacterial biomass took place.

In this phase, the cells that entered the new environment adapted to the new growth conditions, therefore, the change in cell number during the first hours of fermentation was very minimal. After the cell lag phase, the exponential growth (*log*) phase began, during which intensive cell division began. In this phase, the highest cell concentration in the fermentation products was reached (18–20 hours of fermentation: *Priestia* sp. IIIIDEG4 7.9×10^9 CFU mL⁻¹; *Paenibacillus* sp. IIIIDEG36 + *Priestia* sp. IIIIDEG93 6.5×10^9 CFU mL⁻¹; and *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91 7.7×10^9 CFU mL⁻¹). After the log phase changed to a stationary cell growth phase and the glucose concentration in the bacterial suspension reached a minimum concentration (from 200 g L⁻¹ and below), an additional cell nutrient solution was dosed into the bioreactor under aseptic conditions (from approximately 20 hours of the fermentation process in each fermentation). The cell feeding process was performed by dosing the solution at a constant rate of 8–10 mL min⁻¹ and was completed between 35 and 40 hours of fermentation. From 35–40 hours of fermentation, a gradual decrease in cell concentration was observed in the fermentation samples. According to the changes visible in the fermentation process graphs, in particular the decreasing number of revolutions per minute of the mixer and the flow of air supplied to the inside of the bioreactor, the beginning of the cell death phase was observed. The most intense cell death phase in each fermentation process began around the 50th hour of the fermentation process (*Priestia* sp. IIIIDEG4 cells began to form spores; *Paenibacillus* sp. IIIIDEG36 + *Priestia* sp. IIIIDEG93 observed the formation of spores of both strains; *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91 observed the formation of spores of *Bacillus* sp. IJAK27 and *Streptomyces* sp. IJAK91 strains in cells and a decrease in the cell concentration of *Pseudomonas* sp. IJAK44 strain). The fermentation processes in the laboratory volume bioreactor were stopped around the 58–60 hours of fermentation based on the real-time fermentation process graphs created during the bioprocess and after microscopic cell analysis (**Fig. 8**). The final fermentation samples were collected in sterile 250 mL borosilicate glass bottles and stored at 4 °C for further analysis.

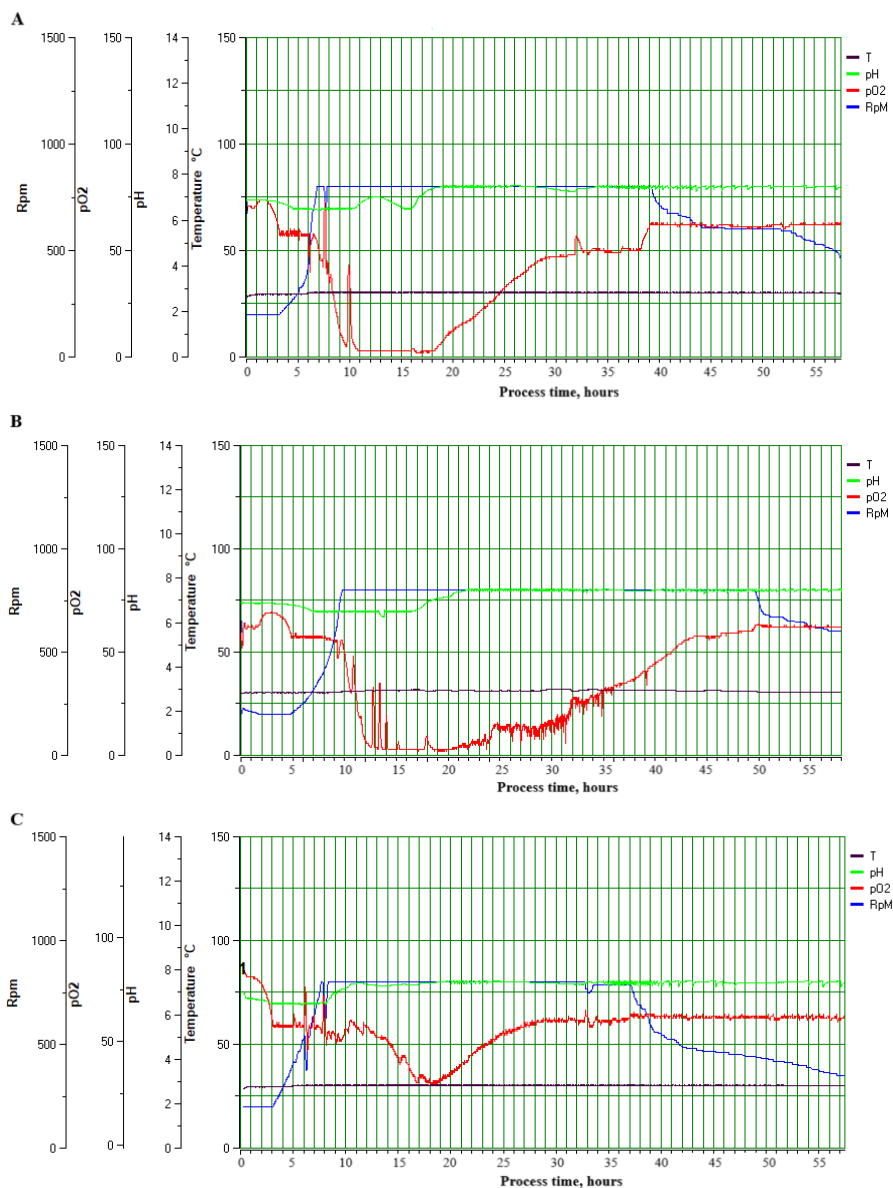


Fig. 8. Process graphs of fermentations performed in 5.4 L laboratory volume bioreactors (EDF 5.4_1): *Priestia* sp. IIIDE4 (A), *Paenibacillus* sp. IIIDE36 + *Priestia* sp. IIIDE93 (B) and *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91 (C).

In the final fermentation samples, the main plant hormones were determined using LC-TOF/MS: auxin group – indole-3-acetic acid; cytokinin group – zeatin; gibberellin group – gibberellic acid (GA3) and abscisic acid. In the supernatants of three *SynComs*, *Priestia* sp. IIIDE4, *Paenibacillus* sp. IIIDE36 + *Priestia* sp. IIIDE93 and *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91, consisting of selected bacterial cells,

four different plant hormones were detected, including indole-3-acetic acid, zeatin, gibberellic acid and abscisic acid. When examining the concentration of the most important auxin class phytohormone, the results showed that the highest concentration of indole-3-acetic acid was found in *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91 cell supernatant ($6.60 \mu\text{g mL}^{-1}$), while *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 + *Priestia* sp. IIIDEG93 and *Priestia* sp. IIIDEG4 had concentrations of $2.18 \mu\text{g mL}^{-1}$ and $1.37 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively (Table 5).

Table 5. Analysis of phytohormones in three different supernatants using LC-TOF/MS.

Sample	Indole-3-acetic acid	Zeatin	Gibberellic acid (GA3)	Abscisic acid
	Concentration, $\mu\text{g mL}^{-1}$			
<i>Priestia</i> sp. IIIDEG4	$1.37 \pm 0.02\text{c}$	$0.22 \pm 0.07\text{a}$	$0.80 \pm 0.06\text{c}$	$0.03 \pm 0.01\text{c}$
<i>Paenibacillus</i> sp. IIIDEG36 + <i>Priestia</i> sp. IIIDEG93	$2.18 \pm 0.22\text{b}$	$0.19 \pm 0.01\text{b}$	$0.28 \pm 0.03\text{b}$	$0.07 \pm 0.02\text{b}$
<i>Bacillus</i> sp. IJAK27 + <i>Pseudomonas</i> sp. IJAK44 + <i>Streptomyces</i> sp. IJAK91	$6.60 \pm 0.50\text{a}$	$0.15 \pm 0.02\text{c}$	$3.40 \pm 0.40\text{a}$	$0.25 \pm 0.02\text{a}$

Data are presented as mean ($n = 6$) $\pm$ standard deviation. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) by one-way ANOVA.

The concentration of one of the most important adenine-type cytokinins, zeatin, in the samples ranged from 0.15 to $0.22 \mu\text{g mL}^{-1}$. The highest concentration was found in the *Priestia* sp. IIIDEG4 sample ($0.22 \mu\text{g mL}^{-1}$). Meanwhile, the supernatant sample of *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 + *Priestia* sp. IIIDEG93 contained $0.19 \mu\text{g mL}^{-1}$, and the supernatant sample of *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91 contained $0.15 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Gibberellic acid (GA3) is one of the main bioactive hormones in the gibberellin group. The highest concentration of GA3 was found in the supernatant of *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91 cells ($3.40 \mu\text{g mL}^{-1}$), while the remaining two samples, *Priestia* sp. IIIDEG4 and *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 + *Priestia* sp. IIIDEG93, at significantly lower concentrations ($0.80 \mu\text{g mL}^{-1}$ and $0.28 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively).

The plant hormone, abscisic acid, is responsible for plant protection against abiotic stresses, and its highest concentration was detected in the supernatant of *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91 cells ($0.25 \mu\text{g mL}^{-1}$). The other two samples, *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 + *Priestia* sp. IIIDEG93 and *Priestia* sp. IIIDEG4, had significantly lower abscisic acid concentrations ($0.07 \mu\text{g mL}^{-1}$ and $0.03 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively) (Table 5).

Microorganism inoculation analyses for *Z. mays*, *P. vulgaris* and *T. aestivum* plant cultures

In studies with *Priestia* sp. IIIDE4, *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 + *Priestia* sp. IIIDEG93 and *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91 were inoculated on all three crops: *Z. mays*, *P. vulgaris* and *T. aestivum*. After cultivation, it was found that inoculation with the microorganisms resulted in a significant increase in the growth indices compared to the control samples CON1 (sample without microorganism inoculation and mineral P fertiliser) and CON2 (sample without microorganism inoculation and with superphosphate fertiliser (NPK 0-19-0) at 200-300 Kg ha⁻¹ according to the manufacturer's rate).

In conclusion, inoculation of the plants with the microbiological preparations showed in all cases better physiological growth results compared to the control. According to the results obtained, it was hypothesised that single inoculation with *Priestia* sp. IIIDE4 strain showed the best vegetative performance of *Z. mays* (5 out of 6 growth indices) and it was the isolation of this microorganism that was carried out in 2020 from the *Z. mays* rhizosphere soil sample. In the *P. vulgaris* culture, it was found that all three test variants *Priestia* sp. IIIDE4, *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 + *Priestia* sp. IIIDEG93 and *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91 showed similar results (4 out of 6 growth indices). Although *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 + *Priestia* sp. IIIDEG93 were isolated from the 2021 *P. vulgaris* rhizosphere soil sample and selected as the best double mixture of different microorganisms, they did not show significant differences in physiological plant growth performance. The analysis with the *T. aestivum* plant culture showed that the test variant *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91 showed unequivocally the best results (6 out of 6 growth indices) compared to the other test variants. It was hypothesised that triple inoculation of *T. aestivum* plants was the most appropriate means to induce plant growth and it was this mixture of microorganisms that was isolated from the rhizosphere soil sample in 2022 (**Table 6**).

Table 6. Results of growth indices of *Z. mays*, *P. vulgaris* and *T. aestivum* plant cultures after exposure of plants to *Priestia* sp. IIIDE4, *Paenibacillus* sp. IIIDE36 + *Priestia* sp. IIIDE93 or *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91 test variants.

Growth indexes	Sample name				
	CON1 [†]	CON2 [‡]	<i>Priestia</i> sp. IIIDE4	<i>Paenibacillus</i> sp. IIIDE36 + <i>Priestia</i> sp. IIIDE93	<i>Bacillus</i> sp. IJAK27 + <i>Pseudomonas</i> sp. IJAK44 + <i>Streptomyces</i> sp. IJAK91
<i>Z. mays</i>					
Shoot length (cm)	41.98 b	42.95 b	49.58 a	49.85 a	49.68 a
Root length (cm)	30.13 c	32.22 bc	38.80 a	37.30 ab	37.13 ab
Shoot fresh weight (g)	10.68 b	10.85 b	15.01 a	14.18 ab	14.02 ab
Root fresh weight (g)	11.50 b	11.50 b	15.92 a	14.58 ab	15.90 a
Shoot dry weight (g)	0.80 c	0.82 bc	1.18 a	1.08 ab	1.13 a
Root dry weight (g)	0.95 b	1.11 ab	1.37 ab	1.28 ab	1.48 a
<i>P. vulgaris</i>					
Shoot length (cm)	52.17 a	53.00 a	64.17 a	63.17 a	63.50 a
Root length (cm)	36.00 b	39.33 ab	47.67 ab	51.83 a	49.50 ab
Shoot fresh weight (g)	4.23 a	4.43 a	5.18 a	5.38 a	5.45 a
Root fresh weight (g)	7.22 b	8.07 ab	9.60 a	10.28 a	9.08 ab
Shoot dry weight (g)	0.40 c	0.42 bc	0.47 ab	0.47 ab	0.50 a
Root dry weight (g)	0.71 b	0.72 b	0.84 a	0.79 ab	0.86 a
<i>T. aestivum</i>					
Shoot length (cm)	51.67 b	55.83 ab	62.33 ab	60.33 ab	63.50 a
Root length (cm)	25.83 c	27.33 bc	33.33 ab	28.50 bc	36.00 a
Shoot fresh weight (g)	6.15 b	6.92 ab	9.53 a	7.68 ab	9.60 a
Root fresh weight (g)	7.05 b	8.68 ab	10.32 a	8.85 ab	10.93 a
Shoot dry weight (g)	0.53 c	0.57 b	0.88 a	0.70 ab	0.87 a
Root dry weight (g)	0.54 c	0.72 b	0.84 ab	0.78 b	0.97 a

[†]CON1: uninoculated treatment; [‡]CON2: uninoculated treatment with superphosphate (NPK 0-19-0).

Data represented as mean (n = 6) ± standard deviation. Different letters indicate significant differences (p < 0.05) in one-way ANOVA.

In order to adapt the use of these mixtures of microorganisms to agricultural plant crops and to adapt these microorganisms to industrial production, more detailed experimental studies and the use of modelled products on agricultural lands under real field conditions are needed. With the changing environmental climate, it is necessary to ensure the appropriate adaptability of microorganisms. Analyses under real environmental conditions must be carried out for at least several years in a row, using agricultural fields in different locations, various cultivated plant crops, and planning more detailed studies. For this purpose, agricultural, scientific and business partners involved in the fields of ecological and industrial biotechnology are needed.

DISCUSSION

The plant microbiome is formed and recruited throughout the life cycle of the host plant. The composition of the root-associated microbiome is a complex multifaceted interaction between abiotic environmental factors and biotic populations [209]. Several studies have shown that bacterial communities in the rhizosphere are dynamically shaped by environmental factors such as season, soil type, soil fertilization history, nutrient and water content, as well as host plant species and developmental stage. The diversity of microorganisms decreases from the bulk soil towards the root surface, i.e. the rhizosphere zone, indicating favourable conditions for the required microbial species to colonize plant roots [210]. Plants excrete about 10–40% of many nutrients, especially fixed carbon, which can enter the rhizosphere through the roots, and therefore the plant actively participates in shaping its core microbiome. The plant-associated microbiome assembly is a sequential process driven by microorganism-microorganism and plant-microorganism interactions [211]. The plant microbiome is typically transmitted horizontally (i.e., acquired from the environment) or vertically (i.e., transmitted via seeds), although the details of horizontal and vertical transmission pathways remain poorly understood [212]. Some genera of microorganisms, such as *Bacillus* or *Pseudomonas*, belong to the core microbiota and are constantly present in relatively high abundance during plant growth. This core microbiota has several beneficial properties, such as increased stress tolerance, positive effects on plant growth, efficient colonization, and protection of plants against harsh environmental conditions [213].

Given today's negative trends in the agricultural industry, such innovations are becoming extremely relevant for environmental and economic reasons. Microbiological preparations help restore the natural vitality of the soil, avoid

excessive use of chemical fertilizers and pesticides, and grow organic production. Although mineral and chemical fertilizers are still widely used in the agricultural industry to this day, there is an increasing concern about their negative impact on the environment and living organisms. The application of PGPR with better properties in agriculture still remains one of the main tools for creating biological preparations with better properties. Although the application of many microorganisms in the agricultural sector to various plant species still remains problematic and not fully known, there is a lot of information in the literature describing that PGPR have shown considerable potential in plant vegetation processes and soil degradation reduction. However, both the processes of isolation and selection of microorganisms, as well as the formation and application of their metabolites to agriculture, must be further optimized and made more efficient. The applicability of microorganisms as microbial fertilizers is already being investigated using well-described strategies and methods, as well as the most widely studied microorganisms. However, it is necessary to search for new, unstudied or poorly studied microorganisms [214].

Soil bacterial communities are crucial components of agricultural systems, as they contribute to plant health and productivity through carbon and nutrient cycling, pesticide degradation, pathogen suppression and plant growth promotion. Recently, recent studies enabled by high-throughput DNA sequencing have revolutionized the study of microbial diversity. Soil physicochemical properties, such as pH, C_{org}, moisture and temperature, are believed to create strong environmental filters on microbial community formation, control microbial activity and are key determinants of soil community composition. New information is constantly emerging in scientific article databases on the effects and adaptability of previously undescribed different microorganisms or mixtures of microorganisms to a variety of different agricultural crop crops [215]. This work aimed to identify, characterize and adapt different microorganisms or mixtures of microorganisms to the agricultural crop crops: *Z. mays*, *P. vulgaris* and *T. aestivum*. The creation of synthetic microbial communities and their potential for application in agricultural applications is one of the most important tasks of this dissertation.

Isolation, selection, identification and phylogenetic analysis of target microorganisms and studies of the relative abundance of the microbiome of *Z. mays*, *P. vulgaris* and *T. aestivum* rhizosphere soil samples were among the first and most important stages of the experimental work, which received the greatest attention. During this stage, a total of 27 different microorganisms (9 isolates in each consecutive year of the study) were isolated and selected from

three different agricultural soils (JAK, BEI and DEG), which were applied the same crop rotation and tillage technology, which may have plant growth-promoting properties. The initial selection of isolates was based on the method that the mixtures of microorganisms should consist of three different genera of microorganisms and that the three selected genera of microorganisms should belong to at least two, and ideally three different phyla of the bacteria. Analysing the scientific literature, it was found that in most agricultural fields and the rhizosphere of the roots of different plant crops grown there, 3 main phyla of bacteria are most dominant: *Pseudomonadota*, *Bacillota*, and *Actinomycetota* [216, 217].

However, the most important attention was paid to the ability of the selected microorganisms to solubilize insoluble phosphate compounds. It was found that the best results of the isolates isolated from the rhizosphere of *Z. mays* in modified NBRIP medium, which included natural fossil phosphate rock from Morocco, were given by double inoculation with IJAK92 + IJAK41 (84.21 mg L⁻¹), double inoculation with IIBEI11 + IIBEI19 (75.60 mg L⁻¹) and single inoculation with IIIDEG4 (94.20 mg L⁻¹). Triple inoculation experiments with *Bacillus*, *Pseudomonas* and *Rhodococcus* species did not show significant results. Based on the literature analysis, it can be assumed that although all three isolates were able to grow in the same environment, an antagonistic effect was observed against *Rhodococcus* isolates in all test variants, and single inoculation with *Rhodococcus* did not show significant results in P solubilization (from 5.45 to 9.06 mg L⁻¹). This could be due to inappropriate growth conditions, i.e. inappropriate medium composition and carbon source, as well as slow *Rhodococcus* cell division. Experiments in which the highest soluble P concentrations in the culture medium were determined consisted of a co-inoculation of *Bacillus* and *Pseudomonas* or a single inoculation of *Bacillus*. This supports the information found in the literature that it is very important to create mixtures of compatible microbial species. Not all *Bacillus* species can grow in the same environment as *Pseudomonas* species, for example, *Pseudomonas fluorescens* can secrete HCN, which inhibits some *Bacillus* species under certain conditions, and *Bacillus subtilis* secretes biosurfactants under certain conditions that affect and disrupt the *Pseudomonas* cell membrane [245]. One study reported that *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus* sp. cultivated in NBRIP medium using tricalcium phosphate (Ca₃(PO₄)₂) as an insoluble phosphate substrate yielded soluble P concentrations of 65.619 µg mL⁻¹ and 560.667 µg mL⁻¹, respectively, but no co-inoculation of these species was performed [246]. To date, no information has been published in the literature on the effect of co-inoculation of *Bacillus* and *Pseudomonas* on the solubilization of insoluble

phosphate compounds, and therefore the results obtained are an important contribution to the knowledge of the use of these microorganisms in agriculture.

After conducting experiments, it was found that the best results of isolates isolated from the rhizosphere of *P. vulgaris* in modified NBRIP medium were shown by triple inoculation tests with IJAK2 + IJAK19 + IJAK94 (93.38 mg L⁻¹), IIBEI80 + IIBEI61 + IIBEI14 (85.75 mg L⁻¹) and IIIDEG9 + IIIDEG36 + IIIDEG93 (98.18 mg L⁻¹). Although the studies found that *Pararhizobium* species in mixtures with *Paenibacillus* and *Bacillus* did not show good growth results ($< 1.5 \times 10^4$ CFU mL⁻¹), they were still able to grow in one environment. The obtained results confirm the literature analysis, which indicates that these three species are found in soils, especially in plant root zones, but their effective compatibility depends on specific conditions - pH, nutrient competition, secreted metabolites. It has also been reported that *Paenibacillus* can promote root growth and thus indirectly improve *Pararhizobium* colonization in plant roots. Although *Pararhizobium* is primarily known for its nitrogen fixation, some strains also exhibit phosphorus solubilizing abilities due to their ability to secrete organic acids [247, 248]. Although the specific phosphorus solubilization rates of *Pararhizobium* are not widely documented, some studies indicate that similar bacteria, such as *Sinorhizobium meliloti*, can secrete dissolved phosphorus concentrations ranging from 500 to 860 mg L⁻¹, depending on growth conditions and metabolites produced [249]. Similarly, direct studies of the interaction between *Paenibacillus* and *P. vulgaris* on the solubilization of insoluble phosphorus compounds are scarce, although *Paenibacillus* may have a positive effect on plant growth and nutrient uptake, particularly through the secretion of IAA. For example, one study demonstrated the ability of *Paenibacillus sonchi* to solubilize hydroxyapatite, an insoluble source of phosphate, while another study demonstrated that *Paenibacillus polymyxa* was able to solubilize up to 2635.3 µg mL⁻¹ of phosphate over 5 days of incubation, reducing the pH of the medium from 6.08 to 3.28 [250]. No studies were found specifically on the effects of *Bacillus* or *Prestia* genera on phosphorus uptake by *P. vulgaris*, but it was found that *Bacillus* sp. isolated from the rhizosphere of *P. vulgaris* roots showed strong antagonistic activity against the pathogen *Alternaria alternata* [251]. No specific studies on the co-inoculation of *Pararhizobium*, *Paenibacillus*, and *Bacillus* in *P. vulgaris* could be found, but one study used *Bradyrhizobium japonicum* 5038, *Bacillus aryabhattai* MB35-5, and *Paenibacillus mucilaginosus* 3016 as PGPR and found that inoculants composed of three different species significantly affected soybean biomass and nitrogen and phosphorus content in the

rhizosphere [252]. Overall, these results indicated that several PGPR with different functions can be combined into composite bacterial inoculants that coordinate the structure of the rhizosphere microbial community and improve the vegetation processes of legumes.

During the work, it was found that the best results of isolates isolated from the rhizosphere of *T. aestivum* in modified NBRIP medium were shown by triple inoculation tests with IJAK27 + IJAK44 + IJAK91 (129.17 mg L⁻¹), double inoculation IIBEI32 + IIIBEI40 (90.95 mg L⁻¹) and no significant differences were observed between double inoculation IIIDEG45 + IIIDEG41 (122.78 mg L⁻¹) and triple inoculation IIIDEG45 + IIIDEG41 + IIIDEG72 (120.78 mg L⁻¹). *Streptomyces* can be used as phosphate-solubilizing microorganisms due to their ability to secrete organic acids, special enzymes (phosphatases) that can break down phytates, and the formation of siderophores that chelate metals and thus release phosphorus from the environment. *Streptomyces griseus* and *Streptomyces lydicus* are two commonly mentioned species that have the ability to solubilize phosphorus and are used as microbial agents to improve plant growth promoting properties [253, 254]. The application of *Pseudomonas moraviensis* and *Bacillus safensis* inoculated *T. aestivum* increased the yield by up to 14.42% compared to the control treatment, as these microorganisms were able to effectively solubilize insoluble phosphate compounds and produce IAA [255]. No data were found in the literature on the co-inoculation of *Streptomyces* with *Pseudomonas* or *Bacillus* genera to promote the growth of *T. aestivum*, especially in the solubilization of phosphate compounds. This is an important factor in selecting suitable biocompatible microbial mixtures for *T. aestivum* plant growth and improved phosphorus availability.

Based on the results obtained in the part of the study with modified NBRIP medium containing natural rock phosphate from Morocco, the most significant soluble phosphorus concentrations were selected from each study group. The analysis of organic acids in the supernatants of NBRIP medium was performed using the liquid chromatography-mass spectrometry (LC-TOF/MS) method. It was found that in the first study group, the highest concentrations of lactic, acetic, gluconic, malic, oxalic and citric acids were isolated by the test variant with a single inoculation of *Priestia* sp. IIIDEG4 (from 13.5 to 419 µg mL⁻¹), while in the second group, the highest concentrations of the indicated organic acids were shown by the double inoculation with *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 + *Priestia* sp. IIIDEG93 (from 14 to 433 µg mL⁻¹), and in the third study group – triple inoculation with *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91 (from 1.2 to 567 µg mL⁻¹). Taking into account the obtained analysis results

and based on literature sources, it was decided to select these three test variants for further research in order to optimize their growth conditions and use for the tested plant cultures.

As the results of the fermentation processes showed, the optimal stopping of the processes occurred at 55–60 hours, which is confirmed by the information found in the literature that the time of formation of microorganisms spores, depending on the type of microorganisms and environmental conditions, varies from 24 to 78 hours [266]. This is especially important in the development of microbiological products, since bacterial spores are resistant to extremely extreme conditions (heat, cold, UV radiation), prolonging the shelf life of products, and spore germination occurs only when they enter a favorable environment, and such adaptation also reduces the costs of product transportation and storage. Often, microorganisms are fermented separately, then their spores are mixed into one product – this ensures the quality and activity of each strain [267]. Although our study has shown that different types of microorganisms are able to grow in one environment, it is important to select suitable species that would not inhibit each other's growth and joint inoculation of microorganisms would be a cost and time saving in industrial terms.

The determination of plant hormones and the evaluation of their concentration and the obtained results supplement the literature data on the ability of microorganisms to synthesize phytohormones, such as auxins, cytokinins, gibberellins and abscisic acid. According to the obtained results, it was determined that the highest concentrations of IAA, GA3 and abscisic acid were obtained by applying a triple inoculation of *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91, but on the contrary, the highest concentration of zeatin was obtained by using a single inoculation of *Priestia* sp. IIIIDEG4. This proves the hypothesis that synergistically acting microorganisms do not always give better results in the isolation of phytohormones than when cultivating only one selected microorganism. However, to clarify the main reasons and evaluate further possibilities is a task for future research.

There is a lot of information in the literature that the same microorganism can give different growth results for different plant species. In this study, microorganisms isolated from the rhizosphere of specific plants were used in cross-tests, i.e. tests were also performed with other plant cultures used in this work. It was found that the best growth index results (5 out of 6 indices) for *Z. mays* plants were obtained after exposure to the *Priestia* sp. IIIIDEG4 isolate, which was isolated and selected from the rhizosphere of *Z. mays* roots as PGPR. Double inoculation with *Paenibacillus* sp. IIIIDEG36 + *Priestia* sp.

IIIDEG93 did not show significant results in the vegetation processes of *P. vulgaris* plants (4 out of 6 indices), whereas single inoculation with *Priestia* sp. IIIDEG4 and triple inoculation with *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91 showed similar results (4 out of 6 growth indices). In the treatment of *T. aestivum*, the most significant results were shown by triple inoculation with *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91 (6 out of 6 growth indices). According to the obtained results of the study, it can be hypothesized that not in all cases the use of more species of microorganisms in plant cultures provides better vegetation parameters or that mixtures of microorganisms must be adapted and analysed in detail. Each microorganism has its own specific interactions with different plant species [268]. The action of microorganisms largely depends on the structure of plant roots. Different plants may have different root structures (e.g. root length, root exudates), which may affect the ability of microorganisms to colonize roots [269].

In conclusion, it can be stated that the application of microorganisms in agricultural practice is an excellent tool to improve the productivity of agricultural plants taking into account ecological problems and by modifying the properties of existing microbiological products or by developing new products that complement natural, naturally occurring plant growth-promoting microorganisms. The results discussed in this work not only expand the knowledge about the diversity, functions and application potential of microorganisms, but also provide a basis for further research on this topic. In the future, it is necessary to conduct experiments and analyses in natural soils in order to confirm the effectiveness of selected isolates or their mixtures under real field conditions. Field tests with microorganisms are necessary, because only under real conditions can their true effectiveness, stability of operation and practical applicability be assessed. Although laboratory and greenhouse experiments are important initial steps, they do not reflect the entire ecological and agronomic reality [280]. The *SynComs* structure strategy must be a combination of plant phenotype selection and more advanced and accurate methods such as metatranscriptomic, metagenomic and metabolomic sequencing to better model predictive traits for targeted *SynComs* design [281].

CONCLUSIONS

1. The results of the microbiota relative abundance studies showed that the genera of rhizospheric microorganisms isolated in this work belonged to the *Actinomycetota* (*Rhodococcus* spp., *Streptomyces* spp.), *Pseudomonadota* (*Pseudomonas* spp., *Pararhizobium* spp.) and *Bacillota* (*Paenibacillus* spp., *Bacillus* spp., *Priestia* spp.) phyla.

2. It was found that the best phosphate solubilization potentials of the genera *Bacillus* (or *Priestia*), *Pseudomonas* and *Rhodococcus* isolated from the rhizosphere of *Z. mays* roots were demonstrated by a single inoculation of a microorganism of the genus *Priestia*; the best phosphate solubilization potentials of the genera *Pararhizobium*, *Paenibacillus* and *Bacillus* (or *Priestia*) isolated from the rhizosphere of *P. vulgaris* roots were demonstrated by a double inoculation of microorganisms of the genera *Paenibacillus* and *Priestia*; The best phosphate solubilization potentials of *Bacillus* (or *Priestia*), *Pseudomonas* and *Streptomyces* genera isolated from the rhizosphere of *T. aestivum* roots were demonstrated by triple inoculation of microorganisms of the *Bacillus*, *Pseudomonas* and *Streptomyces* genera.

3. Qualitative and quantitative analysis of organic acids revealed that the highest concentrations of organic (lactic, acetic, gluconic, malic, oxalic and citric) acids were detected in suspensions of *Priestia* sp. IIIDEG4, *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 + *Priestia* sp. IIIDEG93 and *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91.

4. The nutrient medium and growth parameters of *Priestia* sp. IIIDEG4, *Paenibacillus* sp. IIIDEG36 + *Priestia* sp. IIIDEG93 and *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91 were optimized. Molasses was chosen as the carbon source; as an organic source – yeast extract or soybean peptone; as a nitrogen source – ammonium phosphate; the pH value maintained during fermentations ranged from 6.5 to 7.5; and the process temperature was 30 ± 0.5 °C.

5. It was determined that the following plant hormones were released during fermentations processes: indole-3-acetic acid, zeatin, GA3 and abscisic acid.

6. It was determined that the best vegetation of *Z. mays* was detected with a single inoculation of *Priestia* sp. IIIDEG4; no significant differences were detected in the vegetation of *P. vulgaris* plants between all three test variants; and the best vegetation results of *T. aestivum* plants were obtained with a triple inoculation of *Bacillus* sp. IJAK27 + *Pseudomonas* sp. IJAK44 + *Streptomyces* sp. IJAK91 inoculation.

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju mokslinio darbo vadovams prof. dr. Eglei Lastauskienei ir doc. dr. Audriui Gegeckui už motyvaciją, supratingumą, visapusišką palaikymą, objektyvų vertinimą, pastabas bei patarimus.

Dėkinga AB Roquette Amilina komandai, ypatingai Editai Mažonienei ir Jurgitai Kailiuvienei, kad išleido mane į savo laboratoriją. Taip pat už visapusišką jų pagalbą, patarimus, idėjas ir motyvaciją.

Taip pat norėčiau padėkoti Latvijos universiteto Chemijos fakulteto darbuotojai dr. Lianai Orolai ir jos doktorantei Valdai Valkovskai už bendradarbiavimą rengiant pirmąjį mokslinį straipsnį. Taip pat dėkoju Olandijos organizacijai NovaCropControl už pagalbą atliekant analizes, nuolatinį sklandų komunikavimą, konsultacijas ir patarimus.

Taip pat dėkoju visai UAB Bioenergy LT komandai, o ypatingai gamybinės ir kokybinės laboratorijos merginoms už nuolatinę pagalbą, palaikymą, gražius žodžius ir paskatinimus, kai to labiausiai reikėdavo.

Noriu padėkoti recenzentams doc. dr. Raimondui Šiukštai ir dr. Daivai Burokienei už jų skirtą laiką, konstruktyvų vertinimą ir profesionaliais įžvalgas bei komentarus.

Šilčiausius padėkos žodžius skiriu artimiausiems ir mylimiausiems žmonėms: šeimai, antrajai pusei ir draugams. Ačiū už neišsenkančią kantrybę, padrąsinimus ir rūpestį bei nenuilstantį tikėjimą mano jėgomis.

PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

Disertacijos rezultatai paskelbti straipsniuose:

1. **Mažylytė, R.**; Kaziūnienė, J.; Orola, L.; Valkovska, V.; Lastauskienė, E.; Gegeckas, A. Phosphate Solubilizing Microorganism *Bacillus* sp. MVY-004 and Its Significance for Biomineral Fertilizers' Development in Agrobiotechnology. *Biology* 2022, 11, 254. <https://doi.org/10.3390/biology11020254>.
2. **Mažylytė, R.**; Kailiuvienė, J.; Mažonienė, E.; Orola, L.; Kaziūnienė, J.; Mažylytė, K.; Lastauskienė, E.; Gegeckas, A. The Co-Inoculation Effect on *Triticum aestivum* Growth with Synthetic Microbial Communities (*SynComs*) and Their Potential in Agrobiotechnology. *Plants* 2024, 13, 1716. <https://doi.org/10.3390/plants13121716>.

Kiti straipsniai:

1. Kaziūnienė, J.; **Mažylytė, R.**; Krasauskas, A.; Toleikienė, M.; Gegeckas, A. Optimizing the Growth Conditions of the Selected Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria *Paenibacillus* sp. MVY-024 for Industrial Scale Production. *Biology* 2022, 11, 745. <https://doi.org/10.3390/biology11050745>.
2. Kaziūnienė, J.; Pini, F.; Shamshitov, A.; Razbadauskienė, K.; Frercks, B.; Gegeckas, A.; **Mažylytė, R.**; Lapinskienė, L.; Supronienė, S. Genetic Characterization of *Rhizobium* spp. Strains in an Organic Field Pea (*Pisum sativum* L.) Field in Lithuania. *Plants* 2024, 13, 1888. <https://doi.org/10.3390/plants13141888>.

KONFERENCIJŲ SĄRAŠAS

Disertacijos rezultatai pristatyti 6 konferencijose:

1. **Mažylytė R.**, Kaziūnienė J., Lastauskienė E., Gegeckas A., “Isolation of phosphate solubilizing microorganism and industrial fermentation process optimization”, 64th International conference for students of physics and natural sciences (Open readings), Vilnius, Lithuania, 16-19 March 2021.
2. **Mažylytė R.**, Kaziūnienė J., Gegeckas A., Lastauskienė E., “Organic acids production by phosphate solubilizing microorganism isolated from agricultural soil”, 9th Congress of European Microbiologists (FEMS), World Microbe Forum, 20-24 June 2021 (Web-Conference).
3. **Mažylytė R.**, Kaziūnienė J., Lastauskienė E., Gegeckas A., “Microbial consortium - biostimulant for plants growth promotion and soil improvement”, the 5th Biostimulants World Congress, Florida, USA, 29 November-3 December, 2021 (Web-Conference).
4. **Mažylytė R.**, Kaziūnienė J., Lastauskienė E., Gegeckas A., “Phosphate solubilizing microorganism *Bacillus* sp. MVY-004 significance for the biomineral fertilizers development in agrobiotechnology”, 65th International conference for students of physics and natural sciences (Open readings), Vilnius, Lithuania, 15-18 March 2022 (Web-Conference).
5. **Mažylytė R.**, Gegeckas A., „Towards a chemical pesticide-free agriculture: opportunities for improving soil microbiological activity and plant nutrient availability“, 4th International Scientific Conference AgroEco2022, Kaunas, Lithuania, 26–27 October, 2022.
6. **Mažylytė R.**, Kaziūnienė J., Gegeckas A., “The plant rhizosphere indigenous microbiota modulation and its application and benefits for sustainable agriculture technology”, 10th Congress of European Microbiologists (FEMS), Hamburg, Germany, 9-13 July 2023.

Kitos konferencijos:

1. Kaziūnienė J., **Mažylytė R.**, Gegeckas A., „Isolation and screening of diazotrophic microorganisms which are significant for sustainable agriculture”, 64th International conference for students of physics and natural sciences (Open Readings), Vilnius, Lithuania, 16-19 March 2021.
2. Kaziūnienė J., **Mažylytė R.**, Supronienė S., Gegeckas A., “Isolation of diazotrophic bacteria which are significant for sustainable agriculture”, Annual conference of the association for general and

- applied microbiology (VAAM), 21-23 February 2022 (Web-Conference).
3. Kaziūnienė J., **Mažylytė R.**, Supronienė S., Gegeckas A., “Isolation of diazotrophic bacteria which are significant for sustainable agriculture”, 65th International conference for students of physics and natural sciences (Open readings), Vilnius, Lithuania, 15-18 March 2022 (Web-Conference).
 4. Kaziūnienė J., Gegeckas A., **Mažylytė R.**, Supronienė S. Nitrogen fixation and root nodulation efficiency of Lithuanian *Pisum sativum* variety “Egle DS” after seed inoculation with different *Rhizobium* spp. 21–23 May 2024, Kaunas, Lithuania.

CURRICULUM VITAE (CV)

ASMENINĖ INFORMACIJA

Vardas, pavardė: RAIMONDA MAŽYLYTĖ
Gimimo data: 1995.08.10
E-mail: raimonda.mazylyte@gmail.com

IŠSILAVINIMAS IR KVALIFIKACIJA

Akademiniis ir mokslinis laipsnis	Institucija	Data
Doktorantūros studijos, biologija	Vilniaus Universitetas	2020-2024
Magistro studijos, molekulinė biologija ir biotechnologijos	Vytauto Didžiojo universitetas	2018-2020
Bakalauro studijos, pramoninė biotechnologija	Kauno technologijos universitetas	2014-2018

DARBO PATIRTIS

Pareigos	Institucija	Data
Gamybos vadovė	UAB „Bioenergy LT”	Nuo 2023.09
Vyriausioji mikrobiologė	UAB „Bioenergy LT”	2019.02-2023.09
Mikrobiologė	UAB „Bioenergy LT”	2018.05-2019.01
Tyrėja (Mokslinė praktika)	AB „Roquette Amilina”	2017.10-2018.04
Mikrobiologė (Mokslinė praktika)	MV GROUP PRODUCTION, AB „Anykščių vynas”	2017.06-2017.09

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Pawlak, K.; Kołodziejczak, M. The role of agriculture in ensuring food security in developing countries: Considerations in the context of the problem of sustainable food production. *Sustain.* **2020**, *12*, 5488, doi:10.3390/su12135488.
2. Lemanceau, P.; Maron, P.-A.; Mazurier, S.; Mougél, C.; Pivato, B.; Plassart, P.; Ranjard, L.; Revellin, C.; Tardy, V.; Wipf, D. Understanding and managing soil biodiversity: a major challenge in agroecology. *Agron. Sustain. Dev.* **2015**, *35*, 67–81, doi:10.1007/s13593-014-0247-0.
3. Khangura, R.; Ferris, D.; Wagg, C.; Bowyer, J. Regenerative Agriculture-A Literature Review on the Practices and Mechanisms Used to Improve Soil Health. *Sustainability* **2023**, *15*, 2338, doi:10.3390/su15032338.
4. Boix-Fayos, C.; de Vente, J. Challenges and potential pathways towards sustainable agriculture within the European Green Deal. *Agric. Syst.* **2023**, *207*, 103634, doi:10.1016/j.agsy.2023.103634.
5. De Corato, U.; Viola, E.; Keswani, C.; Minkina, T. Impact of the sustainable agricultural practices for governing soil health from the perspective of a rising agri-based circular bioeconomy. *Appl. Soil Ecol.* **2024**, *194*, 105199, doi:10.1016/j.apsoil.2023.105199.
6. Pernet, C.A.; Ribi Forclaz, A. Revisiting the Food and Agriculture Organization (FAO): International Histories of Agriculture, Nutrition, and Development. *Int. Hist. Rev.* **2019**, *41*, 345–350, doi:10.1080/07075332.2018.1460386.
7. Laishram, B.; Devi, O.R.; Dutta, R.; Senthilkumar, T.; Goyal, G.; Paliwal, D.K.; Panotra, N.; Rasool, A. Plant-microbe interactions: PGPM as microbial inoculants/biofertilizers for sustaining crop productivity and soil fertility. *Curr. Res. Microb. Sci.* **2025**, *8*, 100333, doi:10.1016/j.crmicr.2024.100333.
8. Gomiero, T. Soil Degradation, Land Scarcity and Food Security: Reviewing a Complex Challenge. *Sustainability* **2016**, *8*, 281, doi:10.3390/su8030281.
9. Muhammad, M.; Wahab, A.; Waheed, A.; Hakeem, K.R.; Mohamed, H.I.; Basit, A.; Toor, M.D.; Liu, Y.; Li, L.; Li, W. Navigating Climate Change: Exploring the Dynamics Between Plant–Soil Microbiomes and Their Impact on Plant Growth and Productivity. *Glob. Chang. Biol.* **2025**, *31*, doi:10.1111/gcb.70057.
10. Wei, X.; Xie, B.; Wan, C.; Song, R.; Zhong, W.; Xin, S.; Song, K. Enhancing Soil Health and Plant Growth through Microbial Fertilizers: Mechanisms, Benefits, and Sustainable Agricultural Practices. *Agronomy* **2024**, *14*, 609, doi:10.3390/agronomy14030609.
11. Batista, B.D.; Singh, B.K. Realities and hopes in the application of microbial tools in agriculture. *Microb. Biotechnol.* **2021**, *14*, 1258–

- 1268, doi:10.1111/1751-7915.13866.
12. Sahar Baser Kouchebagh, B.M. and F.F. Improvement of Corn Yield by Seed Biofertilization and Urea Application. *World Appl. Sci. J.* **2012**, *16*, 1239–1242.
 13. Jakienė, E.; Spruogis, V. Biologinių preparatų ir bioorganinių trąšų naudojimas cukrinių runkelių pasėliuose. *Žemės ūkio Moksl.* **2015**, *22*, doi:10.6001/zemesukiomokslai.v22i3.3152.
 14. Jolanta Sinkevičienė, J.P. Biologinės trąšos Fitokondi poveikis ekologiškai augintų bulvių ligoms. *Žmogaus ir Gamt. sauga* **2018**, 1822–1823.
 15. Ieva Gaidė, D.Č. Bakterijų, išskirtų iš dirvožemio, produkuojamų celiuliazų aktyvumo tyrimai ir įvairių terpių panaudojimo galimybės celiuliazų susidarymui. *ŽEMĖS ŪKIO Moksl.* **2019**, *26*, 145–154.
 16. Maestre, F.T.; Solé, R.; Singh, B.K. Microbial biotechnology as a tool to restore degraded drylands. *Microb. Biotechnol.* **2017**, *10*, 1250–1253, doi:10.1111/1751-7915.12832.
 17. Díaz-Rodríguez, A.M.; Parra Cota, F.I.; Cira Chávez, L.A.; García Ortega, L.F.; Estrada Alvarado, M.I.; Santoyo, G.; de los Santos-Villalobos, S. Microbial Inoculants in Sustainable Agriculture: Advancements, Challenges, and Future Directions. *Plants* **2025**, *14*, 191, doi:10.3390/plants14020191.
 18. Kumari, M.; Swarupa, P.; Kesari, K.K.; Kumar, A. Microbial Inoculants as Plant Biostimulants: A Review on Risk Status. *Life* **2022**, *13*, 12, doi:10.3390/life13010012.
 19. Panday, D.; Bhusal, N.; Das, S.; Ghalehgalabbahani, A. Rooted in Nature: The Rise, Challenges, and Potential of Organic Farming and Fertilizers in Agroecosystems. *Sustainability* **2024**, *16*, 1530, doi:10.3390/su16041530.
 20. Hemathilake, D.M.K.S.; Gunathilake, D.M.C.C. Agricultural productivity and food supply to meet increased demands. In *Future Foods*; Elsevier, 2022; pp. 539–553.
 21. Kumar, L.; Chhogyel, N.; Gopalakrishnan, T.; Hasan, M.K.; Jayasinghe, S.L.; Kariyawasam, C.S.; Kogo, B.K.; Ratnayake, S. Climate change and future of agri-food production. In *Future Foods*; Elsevier, 2022; pp. 49–79.
 22. European Parliamentary Research Service. Farming without plant protection products. *Sci. Foresight Unit* **2019**, 1–31.
 23. Krasilnikov, P.; Taboada, M.A.; Amanullah. Fertilizer Use, Soil Health and Agricultural Sustainability. *Agriculture* **2022**, *12*, 462, doi:10.3390/agriculture12040462.
 24. United Nations. *Report of the World Commission on Environment and Development: Our Common Future*; 1987;
 25. Gamage, A.; Gangahagedara, R.; Gamage, J.; Jayasinghe, N.; Kodikara, N.; Suraweera, P.; Merah, O. Role of organic farming for achieving sustainability in agriculture. *Farming Syst.* **2023**, *1*, 100005,

- doi:10.1016/j.farsys.2023.100005.
26. IFOAM – Organics International. *The World of Organic Agriculture Statistics and Emerging Trends 2024* ; 2024;
 27. General Assembly Economic and Social Council. *Progress towards the Sustainable Development Goals* ; 2024;
 28. Bhatnagar, S.; Chaudhary, R.; Sharma, S.; Janjhua, Y.; Thakur, P.; Sharma, P.; Keprate, A. Exploring the dynamics of climate-smart agricultural practices for sustainable resilience in a changing climate. *Environ. Sustain. Indic.* **2024**, *24*, 100535, doi:10.1016/j.indic.2024.100535.
 29. Saleem, A.; Anwar, S.; Nawaz, T.; Fahad, S.; Saud, S.; Ur Rahman, T.; Khan, M.N.R.; Nawaz, T. Securing a sustainable future: the climate change threat to agriculture, food security, and sustainable development goals. *J. Umm Al-Qura Univ. Appl. Sci.* **2024**, doi:10.1007/s43994-024-00177-3.
 30. Muhie, S.H. Novel approaches and practices to sustainable agriculture. *J. Agric. Food Res.* **2022**, *10*, 100446, doi:10.1016/j.jafr.2022.100446.
 31. Bolaji Umar, O.; Amudalat Ranti, L.; Shehu Abdulbaki, A.; Lukman Bola, A.; Khadijat Abdulhamid, A.; Ramat Biola, M.; Oluwagbenga Victor, K. Stresses in Plants: Biotic and Abiotic. In *Current Trends in Wheat Research*; IntechOpen, 2022.
 32. Zhang, Q.F. From Sustainable Agriculture to Sustainable Agrifood Systems: A Comparative Review of Alternative Models. *Sustainability* **2024**, *16*, 9675, doi:10.3390/su16229675.
 33. Chukwuneme, C.F.; Ayangbenro, A.S.; Venturi, V.; Glick, B.R.; Babalola, O.O. Potential innovations from the application of beneficial soil microbes to promote sustainable crop production. *Stud. Univ. Babeş-Bolyai Biol.* **2024**, *69*, 51–86, doi:10.24193/subbbiol.2024.1.03.
 34. Gouda, S.; Kerry, R.G.; Das, G.; Paramithiotis, S.; Shin, H.-S.; Patra, J.K. Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiol. Res.* **2018**, *206*, 131–140, doi:10.1016/j.micres.2017.08.016.
 35. Hassani, M.A.; Durán, P.; Hacquard, S. Microbial interactions within the plant holobiont. *Microbiome* **2018**, *6*, 58, doi:10.1186/s40168-018-0445-0.
 36. *Metagenomic Analysis for Unveiling Agricultural Microbiome*; Liu, Y.-X., Yu, P., Eds.; MDPI, 2024; ISBN 978-3-7258-1321-6.
 37. Ali, Q.; Ali, M.; Jing, H.; Hussain, A.; Manghwar, H.; Ali, M.; Raza, W.; Mundra, S. Power of plant microbiome: A sustainable approach for agricultural resilience. *Plant Stress* **2024**, *14*, 100681, doi:10.1016/j.stress.2024.100681.
 38. Gopal, M.; Gupta, A. Microbiome Selection Could Spur Next-Generation Plant Breeding Strategies. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, doi:10.3389/fmicb.2016.01971.

39. Purohit, H.J.; Pandit, P.; Pal, R.; Warke, R.; Warke, G.M. Soil microbiome: An intrinsic driver for climate smart agriculture. *J. Agric. Food Res.* **2024**, *18*, 101433, doi:10.1016/j.jafr.2024.101433.
40. Gopal, M.; Gupta, A. Microbiome Selection Could Spur Next-Generation Plant Breeding Strategies. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, doi:10.3389/fmicb.2016.01971.
41. Zhang, J.; Cook, J.; Nearing, J.T.; Zhang, J.; Raudonis, R.; Glick, B.R.; Langille, M.G.I.; Cheng, Z. Harnessing the plant microbiome to promote the growth of agricultural crops. *Microbiol. Res.* **2021**, *245*, 126690, doi:10.1016/j.micres.2020.126690.
42. Afridi, M.S.; Javed, M.A.; Ali, S.; De Medeiros, F.H.V.; Ali, B.; Salam, A.; Sumaira; Marc, R.A.; Alkhalifah, D.H.M.; Selim, S.; et al. New opportunities in plant microbiome engineering for increasing agricultural sustainability under stressful conditions. *Front. Plant Sci.* **2022**, *13*, doi:10.3389/fpls.2022.899464.
43. Wang, X.; Chi, Y.; Song, S. Important soil microbiota's effects on plants and soils: a comprehensive 30-year systematic literature review. *Front. Microbiol.* **2024**, *15*, doi:10.3389/fmicb.2024.1347745.
44. Poupin, M.J.; Ledger, T.; Roselló-Móra, R.; González, B. The *Arabidopsis* holobiont: a (re)source of insights to understand the amazing world of plant–microbe interactions. *Environ. Microbiome* **2023**, *18*, 9, doi:10.1186/s40793-023-00466-0.
45. Mahmud, K.; Missaoui, A.; Lee, K.; Ghimire, B.; Presley, H.W.; Makaju, S. Rhizosphere microbiome manipulation for sustainable crop production. *Curr. Plant Biol.* **2021**, *27*, 100210, doi:10.1016/j.cpb.2021.100210.
46. Pantigoso, H.A.; Newberger, D.; Vivanco, J.M. The rhizosphere microbiome: Plant–microbial interactions for resource acquisition. *J. Appl. Microbiol.* **2022**, *133*, 2864–2876, doi:10.1111/jam.15686.
47. Souza, R. de; Ambrosini, A.; Passaglia, L.M.P. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genet. Mol. Biol.* **2015**, *38*, 401–419, doi:10.1590/S1415-475738420150053.
48. Kabir, A.H.; Baki, M.Z.I.; Ahmed, B.; Mostofa, M.G. Current, faltering, and future strategies for advancing microbiome-assisted sustainable agriculture and environmental resilience. *New Crop.* **2024**, *1*, 100013, doi:10.1016/j.ncrops.2024.100013.
49. Shayanthan, A.; Ordoñez, P.A.C.; Oresnik, I.J. The Role of Synthetic Microbial Communities (SynComs) in Sustainable Agriculture. *Front. Agron.* **2022**, *4*, doi:10.3389/fagro.2022.896307.
50. Nwachukwu, B.C.; Babalola, O.O. Metagenomics: A Tool for Exploring Key Microbiome With the Potentials for Improving Sustainable Agriculture. *Front. Sustain. Food Syst.* **2022**, *6*, doi:10.3389/fsufs.2022.886987.
51. Basu, A.; Prasad, P.; Das, S.N.; Kalam, S.; Sayyed, R.Z.; Reddy, M.S.; El Enshasy, H. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) as

- Green Bioinoculants: Recent Developments, Constraints, and Prospects. *Sustainability* **2021**, *13*, 1140, doi:10.3390/su13031140.
52. Marín, O.; González, B.; Poupin, M.J. From Microbial Dynamics to Functionality in the Rhizosphere: A Systematic Review of the Opportunities With Synthetic Microbial Communities. *Front. Plant Sci.* **2021**, *12*, doi:10.3389/fpls.2021.650609.
 53. Qiu, Z.; Egidi, E.; Liu, H.; Kaur, S.; Singh, B.K. New frontiers in agriculture productivity: Optimised microbial inoculants and in situ microbiome engineering. *Biotechnol. Adv.* **2019**, *37*, 107371, doi:10.1016/j.biotechadv.2019.03.010.
 54. Harman, G.E.; Uphoff, N. Symbiotic Root-Endophytic Soil Microbes Improve Crop Productivity and Provide Environmental Benefits. *Scientifica (Cairo)*. **2019**, *2019*, 1–25, doi:10.1155/2019/9106395.
 55. Patowary, K.; Patowary, R.; Kalita, M.C.; Deka, S. Development of an Efficient Bacterial Consortium for the Potential Remediation of Hydrocarbons from Contaminated Sites. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, doi:10.3389/fmicb.2016.01092.
 56. Doolotkeldieva, T.; Konurbaeva, M.; Bobusheva, S. Microbial communities in pesticide-contaminated soils in Kyrgyzstan and bioremediation possibilities. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2018**, *25*, 31848–31862, doi:10.1007/s11356-017-0048-5.
 57. Lobo, C.B.; Juárez Tomás, M.S.; Viruel, E.; Ferrero, M.A.; Lucca, M.E. Development of low-cost formulations of plant growth-promoting bacteria to be used as inoculants in beneficial agricultural technologies. *Microbiol. Res.* **2019**, *219*, 12–25, doi:10.1016/j.micres.2018.10.012.
 58. O’Callaghan, M.; Ballard, R.A.; Wright, D. Soil microbial inoculants for sustainable agriculture: Limitations and opportunities. *Soil Use Manag.* **2022**, *38*, 1340–1369, doi:10.1111/sum.12811.
 59. Bechtaoui, N.; Rabiou, M.K.; Raklami, A.; Oufdou, K.; Hafidi, M.; Jemo, M. Phosphate-Dependent Regulation of Growth and Stresses Management in Plants. *Front. Plant Sci.* **2021**, *12*, doi:10.3389/fpls.2021.679916.
 60. Guan, X.; Chen, J.; Liu, G.; Wang, X. Soil Phosphorus Forms in Saline Soil after the Application of Biomass Materials. *Agronomy* **2024**, *14*, 255, doi:10.3390/agronomy14020255.
 61. Johan, P.D.; Ahmed, O.H.; Omar, L.; Hasbullah, N.A. Phosphorus Transformation in Soils Following Co-Application of Charcoal and Wood Ash. *Agronomy* **2021**, *11*, 2010, doi:10.3390/agronomy11102010.
 62. Badu Brempong, M.; Addo-Danso, A. Improving Soil Fertility with Organic Fertilizers. In *New Generation of Organic Fertilizers*; IntechOpen, 2022.
 63. Lun, F.; Sardans, J.; Sun, D.; Xiao, X.; Liu, M.; Li, Z.; Wang, C.; Hu, Q.; Tang, J.; Ciais, P.; et al. Influences of international agricultural

- trade on the global phosphorus cycle and its associated issues. *Glob. Environ. Chang.* **2021**, *69*, 102282, doi:10.1016/j.gloenvcha.2021.102282.
64. Bindraban, P.S.; Dimkpa, C.O.; Pandey, R. Exploring phosphorus fertilizers and fertilization strategies for improved human and environmental health. *Biol. Fertil. Soils* **2020**, *56*, 299–317, doi:10.1007/s00374-019-01430-2.
 65. Silva, L.I. da; Pereira, M.C.; Carvalho, A.M.X. de; Buttrós, V.H.; Pasqual, M.; Dória, J. Phosphorus-Solubilizing Microorganisms: A Key to Sustainable Agriculture. *Agriculture* **2023**, *13*, 462, doi:10.3390/agriculture13020462.
 66. Zuluaga, M.Y.A.; de Oliveira, A.L.M.; Valentinuzzi, F.; Jayme, N.S.; Monterisi, S.; Fattorini, R.; Cesco, S.; Pii, Y. An insight into the role of the organic acids produced by *Enterobacter* sp. strain 15S in solubilizing tricalcium phosphate: in situ study on cucumber. *BMC Microbiol.* **2023**, *23*, 184, doi:10.1186/s12866-023-02918-6.
 67. Timofeeva, A.; Galyamova, M.; Sedykh, S. Prospects for Using Phosphate-Solubilizing Microorganisms as Natural Fertilizers in Agriculture. *Plants* **2022**, *11*, 2119, doi:10.3390/plants11162119.
 68. Pan, L.; Cai, B. Phosphate-Solubilizing Bacteria: Advances in Their Physiology, Molecular Mechanisms and Microbial Community Effects. *Microorganisms* **2023**, *11*, 2904, doi:10.3390/microorganisms11122904.
 69. Kaur, C.; Selvakumar, G.; Upreti, K.K. Organic Acid Profiles of Phosphate Solubilizing Bacterial Strains in the Presence of Different Insoluble Phosphatic Sources Under In vitro Buffered Conditions. *J. Pure Appl. Microbiol.* **2021**, *15*, 1006–1015, doi:10.22207/JPAM.15.2.59.
 70. Li, G.-X.; Wu, X.-Q.; Ye, J.-R.; Yang, H.-C. Characteristics of Organic Acid Secretion Associated with the Interaction between *Burkholderia multivorans* WS-FJ9 and Poplar Root System. *Biomed Res. Int.* **2018**, *2018*, 1–12, doi:10.1155/2018/9619724.
 71. Mažylytė, R.; Kaziūnienė, J.; Orola, L.; Valkovska, V.; Lastauskienė, E.; Gegeckas, A. Phosphate Solubilizing Microorganism *Bacillus* sp. MVY-004 and Its Significance for Biomineral Fertilizers' Development in Agrobiotechnology. *Biology (Basel)*. **2022**, *11*, 254, doi:10.3390/biology11020254.
 72. Richardson, A.E.; Hocking, P.J.; Simpson, R.J.; George, T.S. Plant mechanisms to optimise access to soil phosphorus. *Crop Pasture Sci.* **2009**, *60*, 124, doi:10.1071/CP07125.
 73. Roychoudhry, S.; Kepinski, S. Auxin in Root Development. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2021**, a039933, doi:10.1101/cshperspect.a039933.
 74. Nadira, U.A.; Ahmed, I.M.; Wu, F.; Zhang, G. The regulation of root growth in response to phosphorus deficiency mediated by

- phytohormones in a Tibetan wild barley accession. *Acta Physiol. Plant.* **2016**, *38*, 105, doi:10.1007/s11738-016-2124-8.
75. De Andrade, S.A.L.; Borghi, A.A.; De Oliveira, V.H.; Gouveia, L. de M.; Martins, A.P.I.; Mazzafera, P. Phosphorus Shortage Induces an Increase in Root Exudation in Fifteen Eucalypts Species. *Agronomy* **2022**, *12*, 2041, doi:10.3390/agronomy12092041.
 76. Chen, L.; Liu, Y. The Function of Root Exudates in the Root Colonization by Beneficial Soil Rhizobacteria. *Biology (Basel)*. **2024**, *13*, 95, doi:10.3390/biology13020095.
 77. Upadhyay, S.K.; Srivastava, A.K.; Rajput, V.D.; Chauhan, P.K.; Bhojiya, A.A.; Jain, D.; Chaubey, G.; Dwivedi, P.; Sharma, B.; Minkina, T. Root Exudates: Mechanistic Insight of Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Sustainable Crop Production. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, doi:10.3389/fmicb.2022.916488.
 78. Adeleke, R.; Nwangburuka, C.; Oboirien, B. Origins, roles and fate of organic acids in soils: A review. *South African J. Bot.* **2017**, *108*, 393–406, doi:10.1016/j.sajb.2016.09.002.
 79. Chauhan, P.; Sharma, N.; Tapwal, A.; Kumar, A.; Verma, G.S.; Meena, M.; Seth, C.S.; Swapnil, P. Soil Microbiome: Diversity, Benefits and Interactions with Plants. *Sustainability* **2023**, *15*, 14643, doi:10.3390/su151914643.
 80. Tian, J.; Ge, F.; Zhang, D.; Deng, S.; Liu, X. Roles of Phosphate Solubilizing Microorganisms from Managing Soil Phosphorus Deficiency to Mediating Biogeochemical P Cycle. *Biology (Basel)*. **2021**, *10*, 158, doi:10.3390/biology10020158.
 81. Swarnalakshmi, K.; Yadav, V.; Tyagi, D.; Dhar, D.W.; Kannepalli, A.; Kumar, S. Significance of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Grain Legumes: Growth Promotion and Crop Production. *Plants* **2020**, *9*, 1596, doi:10.3390/plants9111596.
 82. Bargaz, A.; Elhaisoufi, W.; Khourchi, S.; Benmrid, B.; Borden, K.A.; Rchiad, Z. Benefits of phosphate solubilizing bacteria on belowground crop performance for improved crop acquisition of phosphorus. *Microbiol. Res.* **2021**, *252*, 126842, doi:10.1016/j.micres.2021.126842.
 83. Gonzalez, J.M.; Aranda, B. Microbial Growth under Limiting Conditions-Future Perspectives. *Microorganisms* **2023**, *11*, 1641, doi:10.3390/microorganisms11071641.
 84. Harirchi, S.; Sar, T.; Ramezani, M.; Aliyu, H.; Etemadifar, Z.; Nojoumi, S.A.; Yazdian, F.; Awasthi, M.K.; Taherzadeh, M.J. Bacillales: From Taxonomy to Biotechnological and Industrial Perspectives. *Microorganisms* **2022**, *10*, 2355, doi:10.3390/microorganisms10122355.
 85. Qian, J.; Wang, Y.; Hu, Z.; Shi, T.; Wang, Y.; Ye, C.; Huang, H. *Bacillus* sp. as a microbial cell factory: Advancements and future prospects. *Biotechnol. Adv.* **2023**, *69*, 108278,

- doi:10.1016/j.biotechadv.2023.108278.
86. Cuadrado-Osorio, P.D.; Ramírez-Mejía, J.M.; Mejía-Avellaneda, L.F.; Mesa, L.; Bautista, E.J. Agro-industrial residues for microbial bioproducts: A key booster for bioeconomy. *Bioresour. Technol. Reports* **2022**, *20*, 101232, doi:10.1016/j.biteb.2022.101232.
 87. Bajić, B.; Vučurović, D.; Vasić, Đ.; Jevtić-Mučibabić, R.; Dodić, S. Biotechnological Production of Sustainable Microbial Proteins from Agro-Industrial Residues and By-Products. *Foods* **2022**, *12*, 107, doi:10.3390/foods12010107.
 88. Lee, S.Y.; Kim, H.U. Systems strategies for developing industrial microbial strains. *Nat. Biotechnol.* **2015**, *33*, 1061–1072, doi:10.1038/nbt.3365.
 89. Zhou, T.; Reji, R.; Kairon, R.S.; Chiam, K.H. A review of algorithmic approaches for cell culture media optimization. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2023**, *11*, doi:10.3389/fbioe.2023.1195294.
 90. Parchaykina, M. V.; Liyaskina, E. V.; Bogatyreva, A.O.; Baykov, M.A.; Gotina, D.S.; Arzhanov, N.E.; Netrusov, A.I.; Revin, V. V. Cost-Effective Production of Bacterial Cellulose and Tubular Materials by Cultivating *Komagataeibacter sucrofermentans* B-11267 on a Molasses Medium. *Polymers (Basel)*. **2025**, *17*, 179, doi:10.3390/polym17020179.
 91. Abedi, E.; Hashemi, S.M.B. Lactic acid production – producing microorganisms and substrates sources-state of art. *Heliyon* **2020**, *6*, e04974, doi:10.1016/j.heliyon.2020.e04974.
 92. Sun, W.; Shahrajabian, M.H.; Lin, M. Research Progress of Fermented Functional Foods and Protein Factory-Microbial Fermentation Technology. *Fermentation* **2022**, *8*, 688, doi:10.3390/fermentation8120688.
 93. Sharma, R.; Garg, P.; Kumar, P.; Bhatia, S.K.; Kulshrestha, S. Microbial Fermentation and Its Role in Quality Improvement of Fermented Foods. *Fermentation* **2020**, *6*, 106, doi:10.3390/fermentation6040106.
 94. Tao, Z.; Yuan, H.; Liu, M.; Liu, Q.; Zhang, S.; Liu, H.; Jiang, Y.; Huang, D.; Wang, T. Yeast Extract: Characteristics, Production, Applications and Future Perspectives. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2023**, *33*, 151–166, doi:10.4014/jmb.2207.07057.
 95. Tomé, D. Yeast Extracts: Nutritional and Flavoring Food Ingredients. *ACS Food Sci. Technol.* **2021**, *1*, 487–494, doi:10.1021/acsfoodscitech.0c00131.
 96. Lei, F.; Chen, Y.; Zhang, L.; He, D. Production of aminopeptidase from soybean meal with nutrients supplementation by *Bacillus licheniformis* SWJS33: Feasibility and metabolic process. *LWT* **2021**, *152*, 112392, doi:10.1016/j.lwt.2021.112392.
 97. Dodds, W.K.; Whiles, M.R. Nitrogen, Sulfur, Phosphorus, and Other Nutrients. In *Freshwater Ecology*; Elsevier, 2020; pp. 395–424.

98. Yao, M.; Ma, C.; Bian, X.; Yang, Y.; Xu, Y.; Wu, Q.; Xu, X.; Li, L.; Zhang, N.; Tian, Y. Isolation and Optimal Fermentation Conditions of *Bacillus licheniformis* SFD-Y5 for a New Douchi Fibrinolytic Enzyme Producer. *Fermentation* **2023**, *9*, 668, doi:10.3390/fermentation9070668.
99. Erkmen, O. Counting of cold-tolerant microorganisms. In *Microbiological Analysis of Foods and Food Processing Environments*; Elsevier, 2022; pp. 73–75.
100. Mohanty, A.; Shilpa; Meena, S.S. Microbial adaptation to extreme temperatures: an overview of molecular mechanisms to industrial application. In *Extremozymes and Their Industrial Applications*; Elsevier, 2022; pp. 115–139.
101. Ghosh, S.; Lepcha, K.; Basak, A.; Mahanty, A.K. Thermophiles and thermophilic hydrolases. In *Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles*; Elsevier, 2020; pp. 219–236.
102. Jin, Q.; Kirk, M.F. pH as a Primary Control in Environmental Microbiology: 1. Thermodynamic Perspective. *Front. Environ. Sci.* **2018**, *6*, doi:10.3389/fenvs.2018.00021.
103. Cole, S.D.; Rankin, S.C. Isolation and Identification of Aerobic and Anaerobic Bacteria. In *Greene's Infectious Diseases of the Dog and Cat*; Elsevier, 2021; pp. 19–30.
104. Wang, L.; Fan, D.; Chen, W.; Terentjev, E.M. Bacterial growth, detachment and cell size control on polyethylene terephthalate surfaces. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 15159, doi:10.1038/srep15159.
105. Singh, V.; Haque, S.; Niwas, R.; Srivastava, A.; Pasupuleti, M.; Tripathi, C.K.M. Strategies for Fermentation Medium Optimization: An In-Depth Review. *Front. Microbiol.* **2017**, *7*, doi:10.3389/fmicb.2016.02087.
106. Garrison, A.T.; Huigens, R.W. Eradicating Bacterial Biofilms with Natural Products and their Inspired Analogues that Operate Through Unique Mechanisms. *Curr. Top. Med. Chem.* **2017**, *17*, 1954–1964, doi:10.2174/1568026617666161214150959.
107. Hanif, M.S.; Tayyab, M.; Baillo, E.H.; Islam, M.M.; Islam, W.; Li, X. Plant microbiome technology for sustainable agriculture. *Front. Microbiol.* **2024**, *15*, doi:10.3389/fmicb.2024.1500260.
108. Li, J.; Wang, J.; Liu, H.; Macdonald, C.A.; Singh, B.K. Application of microbial inoculants significantly enhances crop productivity: A meta-analysis of studies from 2010 to 2020. *J. Sustain. Agric. Environ.* **2022**, *1*, 216–225, doi:10.1002/sae2.12028.
109. Singh, V.; Kumar, B. A review of agricultural microbial inoculants and their carriers in bioformulation. *Rhizosphere* **2024**, *29*, 100843, doi:10.1016/j.rhisph.2023.100843.
110. Hadacek, F. Low-molecular-weight metabolite systems chemistry. *Front. Environ. Sci.* **2015**, *3*, doi:10.3389/fenvs.2015.00012.
111. Cortez, R. V.; Moreira, L.N.; Taddei, C.R. Metabolome and

- Microbiome From Infancy to Elderly. In *Microbiome and Metabolome in Diagnosis, Therapy, and other Strategic Applications*; Elsevier, 2019; pp. 85–89.
112. Horak, I.; Engelbrecht, G.; Rensburg, P.J.J.; Claassens, S. Microbial metabolomics: essential definitions and the importance of cultivation conditions for utilizing *Bacillus* species as bionematicides. *J. Appl. Microbiol.* **2019**, *127*, 326–343, doi:10.1111/jam.14218.
 113. Pott, D.M.; Osorio, S.; Vallarino, J.G. From Central to Specialized Metabolism: An Overview of Some Secondary Compounds Derived From the Primary Metabolism for Their Role in Conferring Nutritional and Organoleptic Characteristics to Fruit. *Front. Plant Sci.* **2019**, *10*, doi:10.3389/fpls.2019.00835.
 114. PANT, B.; PANT, P.; ERBAN, A.; HUHMAN, D.; KOPKA, J.; SCHEIBLE, W. Identification of primary and secondary metabolites with phosphorus status-dependent abundance in *A. rabisopsis*, and of the transcription factor PHR 1 as a major regulator of metabolic changes during phosphorus limitation. *Plant. Cell Environ.* **2015**, *38*, 172–187, doi:10.1111/pce.12378.
 115. Maeda, H.A. Evolutionary Diversification of Primary Metabolism and Its Contribution to Plant Chemical Diversity. *Front. Plant Sci.* **2019**, *10*, doi:10.3389/fpls.2019.00881.
 116. Tamano, K. Enhancing microbial metabolite and enzyme production: current strategies and challenges. *Front. Microbiol.* **2014**, *5*, doi:10.3389/fmicb.2014.00718.
 117. Rusu, A.V.; Trif, M.; Rocha, J.M. Microbial Secondary Metabolites via Fermentation Approaches for Dietary Supplementation Formulations. *Molecules* **2023**, *28*, 6020, doi:10.3390/molecules28166020.
 118. Spatafora, J.W.; Bushley, K.E. Phylogenomics and evolution of secondary metabolism in plant-associated fungi. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2015**, *26*, 37–44, doi:10.1016/j.pbi.2015.05.030.
 119. Ayed, H. Ben; Maalej, H.; Hmidet, N.; Nasri, M. Isolation and biochemical characterisation of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens* An6. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **2015**, *3*, 255–261, doi:10.1016/j.jgar.2015.07.001.
 120. Elhamouly, N.A.; Hewedy, O.A.; Zaitoon, A.; Miraples, A.; Elshorbagy, O.T.; Hussien, S.; El-Tahan, A.; Peng, D. The hidden power of secondary metabolites in plant-fungi interactions and sustainable phytoremediation. *Front. Plant Sci.* **2022**, *13*, doi:10.3389/fpls.2022.1044896.
 121. Andryukov, B.; Mikhailov, V.; Besednova, N. The Biotechnological Potential of Secondary Metabolites from Marine Bacteria. *J. Mar. Sci. Eng.* **2019**, *7*, 176, doi:10.3390/jmse7060176.
 122. Tyc, , Olaf; Song, C.; Dickschat, J.S.; Vos, M.; Garbeva, P. The Ecological Role of Volatile and Soluble Secondary Metabolites

- Produced by Soil Bacteria. *Trends Microbiol.* **2017**, 25, 280–292, doi:10.1016/j.tim.2016.12.002.
123. Qin, R.; Gao, S.; Ajwa, H.; Hanson, B.D. Effect of application rate on fumigant degradation in five agricultural soils. *Sci. Total Environ.* **2016**, 541, 528–534, doi:10.1016/j.scitotenv.2015.09.062.
 124. Singh, R.; Kumar, M.; Mittal, A.; Mehta, P.K. Microbial metabolites in nutrition, healthcare and agriculture. *3 Biotech* **2017**, 7, 15, doi:10.1007/s13205-016-0586-4.
 125. Pradeepa, P. Secondary Metabolites Synthesis in Microorganisms. *Indian J. Appl. Microbiol.* **2019**, 22, 26–32, doi:10.46798/ijam.2019.v22i02.004.
 126. Abdel-Aziz, S.M.; Abo Elsoud, M.M.; Anise, A.A.H. Microbial Biosynthesis: A Repertory of Vital Natural Products. In *Food Biosynthesis*; Elsevier, 2017; pp. 25–54.
 127. Thirumurugan, D.; Cholarajan, A.; Raja, S.S.S.; Vijayakumar, R. An Introductory Chapter: Secondary Metabolites. In *Secondary Metabolites - Sources and Applications*; InTech, 2018.
 128. Mariya Lobanovska and Giulia Pilla. Penicillin's Discovery and Antibiotic Resistance: Lessons for the Future? *YALE J. Biol. Med.* **2017**, 135–145.
 129. Gaynes, R. The Discovery of Penicillin—New Insights After More Than 75 Years of Clinical Use. *Emerg. Infect. Dis.* **2017**, 23, 849–853, doi:10.3201/eid2305.161556.
 130. Souto, A.L.; Sylvestre, M.; Tölke, E.D.; Tavares, J.F.; Barbosa-Filho, J.M.; Cebrián-Torrejón, G. Plant-Derived Pesticides as an Alternative to Pest Management and Sustainable Agricultural Production: Prospects, Applications and Challenges. *Molecules* **2021**, 26, 4835, doi:10.3390/molecules26164835.
 131. Araújo, M.F.; Castanheira, E.M.S.; Sousa, S.F. The Buzz on Insecticides: A Review of Uses, Molecular Structures, Targets, Adverse Effects, and Alternatives. *Molecules* **2023**, 28, 3641, doi:10.3390/molecules28083641.
 132. Parween, T.; Jan, S. Perceptive exploitation of pesticides. In *Ecophysiology of Pesticides*; Elsevier, 2019; pp. 189–222.
 133. Soberón, M.; Bravo, A.; Blanco, C.A. Strategies to Reduce Insecticide Use in Agricultural Production. In *Sustainable Food Science - A Comprehensive Approach*; Elsevier, 2023; pp. 507–514.
 134. Park, H.-W.; Bideshi, D.K.; Federici, B.A. Properties and applied use of the mosquitocidal bacterium, *Bacillus sphaericus*. *J. Asia. Pac. Entomol.* **2010**, 13, 159–168, doi:10.1016/j.aspen.2010.03.002.
 135. Fanai, A.; Bohia, B.; Lalremruati, F.; Lalhriatpuii, N.; Lalrokimi; Lalmuanpuii, R.; Singh, P.K.; Zothanpuia. Plant growth promoting bacteria (PGPB)-induced plant adaptations to stresses: an updated review. *PeerJ* **2024**, 12, e17882, doi:10.7717/peerj.17882.
 136. Tadesse Mawcha, K.; Malinga, L.; Muir, D.; Ge, J.; Ndolo, D. Recent

- Advances in Biopesticide Research and Development with a Focus on Microbials. *F1000Research* **2025**, *13*, 1071, doi:10.12688/f1000research.154392.5.
137. Sala, A.; Vittone, S.; Barrena, R.; Sánchez, A.; Artola, A. Scanning agro-industrial wastes as substrates for fungal biopesticide production: Use of *Beauveria bassiana* and *Trichoderma harzianum* in solid-state fermentation. *J. Environ. Manage.* **2021**, *295*, 113113, doi:10.1016/j.jenvman.2021.113113.
 138. Yao, X.; Guo, H.; Zhang, K.; Zhao, M.; Ruan, J.; Chen, J. *Trichoderma* and its role in biological control of plant fungal and nematode disease. *Front. Microbiol.* **2023**, *14*, doi:10.3389/fmicb.2023.1160551.
 139. Iida, Y.; Higashi, Y.; Nishi, O.; Kouda, M.; Maeda, K.; Yoshida, K.; Asano, S.; Kawakami, T.; Nakajima, K.; Kuroda, K.; et al. Entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*–based bioinsecticide suppresses severity of powdery mildews of vegetables by inducing the plant defense responses. *Front. Plant Sci.* **2023**, *14*, doi:10.3389/fpls.2023.1211825.
 140. Jiang, Y.; Wang, J. The Registration Situation and Use of Mycopesticides in the World. *J. Fungi* **2023**, *9*, 940, doi:10.3390/jof9090940.
 141. Zhao, H.; Zhou, T.; Xie, J.; Cheng, J.; Jiang, D.; Fu, Y. Host Transcriptional Response of *Sclerotinia sclerotiorum* Induced by the Mycoparasite *Coniothyrium minitans*. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, doi:10.3389/fmicb.2020.00183.
 142. Islam, A.K.M.M.; Karim, S.M.R.; Kheya, S.A.; Yeasmin, S. Unlocking the potential of bioherbicides for sustainable and environment friendly weed management. *Heliyon* **2024**, *10*, e36088, doi:10.1016/j.heliyon.2024.e36088.
 143. Guerrero Ramírez, J.R.; Ibarra Muñoz, L.A.; Balagurusamy, N.; Frías Ramírez, J.E.; Alfaro Hernández, L.; Carrillo Campos, J. Microbiology and Biochemistry of Pesticides Biodegradation. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 15969, doi:10.3390/ijms242115969.
 144. Gu, Q.; Chu, S.; Huang, Q.; Chen, A.; Li, L.; Li, R. *Colletotrichum echinochloae*: A Potential Bioherbicide Agent for Control of Barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv.). *Plants* **2023**, *12*, 421, doi:10.3390/plants12030421.
 145. Golijan-Pantović, J.; Sečanski, M.; Gordanić, S.; Šarčević-Todosijević, L. Weed biological control with fungi-based bioherbicides. *Acta Agric. Serbica* **2023**, *28*, 23–37, doi:10.5937/AASer2355023G.
 146. Hasan, M.; Ahmad-Hamdani, M.S.; Rosli, A.M.; Hamdan, H. Bioherbicides: An Eco-Friendly Tool for Sustainable Weed Management. *Plants* **2021**, *10*, 1212, doi:10.3390/plants10061212.
 147. Nambara, E. Plant Hormones. In *Reference Module in Life Sciences*; Elsevier, 2017.

148. Timofeeva, A.M.; Galyamova, M.R.; Sedykh, S.E. How Do Plant Growth-Promoting Bacteria Use Plant Hormones to Regulate Stress Reactions? *Plants* **2024**, *13*, 2371, doi:10.3390/plants13172371.
149. Kim, S.W.; Goossens, A.; Libert, C.; Van Immerseel, F.; Staal, J.; Beyaert, R. Phytohormones: Multifunctional nutraceuticals against metabolic syndrome and comorbid diseases. *Biochem. Pharmacol.* **2020**, *175*, 113866, doi:10.1016/j.bcp.2020.113866.
150. Timofeeva, A.M.; Galyamova, M.R.; Sedykh, S.E. How Do Plant Growth-Promoting Bacteria Use Plant Hormones to Regulate Stress Reactions? *Plants* **2024**, *13*, 2371, doi:10.3390/plants13172371.
151. Tsukanova, K.A.; Chebotar, V.K.; Meyer, J.J.M.; Bibikova, T.N. Effect of plant growth-promoting Rhizobacteria on plant hormone homeostasis. *South African J. Bot.* **2017**, *113*, 91–102, doi:10.1016/j.sajb.2017.07.007.
152. Amara, U.; Khalid, R.; Hayat, R. Soil Bacteria and Phytohormones for Sustainable Crop Production. In; 2015; pp. 87–103.
153. Khan, N. Decoding phytohormone signaling in plant stress physiology: Insights, challenges, and future directions. *Environ. Exp. Bot.* **2025**, *231*, 106099, doi:10.1016/j.envexpbot.2025.106099.
154. Singh, R.; Kumar, M.; Mittal, A.; Mehta, P.K. Microbial metabolites in nutrition, healthcare and agriculture. *3 Biotech* **2017**, *7*, 15, doi:10.1007/s13205-016-0586-4.
155. Su, Y.; Xia, S.; Wang, R.; Xiao, L. Phytohormonal quantification based on biological principles. In *Hormone Metabolism and Signaling in Plants*; Elsevier, 2017; pp. 431–470.
156. Durmusoglu, S.; Saglam, A.; Kadioglu, A. Modulation of HSPs by phytohormone applications. In *Improving Stress Resilience in Plants*; Elsevier, 2024; pp. 277–295.
157. Etesami, H.; Glick, B.R. Bacterial indole-3-acetic acid: A key regulator for plant growth, plant-microbe interactions, and agricultural adaptive resilience. *Microbiol. Res.* **2024**, *281*, 127602, doi:10.1016/j.micres.2024.127602.
158. Fu, S.-F.; Wei, J.-Y.; Chen, H.-W.; Liu, Y.-Y.; Lu, H.-Y.; Chou, J.-Y. Indole-3-acetic acid: A widespread physiological code in interactions of fungi with other organisms. *Plant Signal. Behav.* **2015**, *10*, e1048052, doi:10.1080/15592324.2015.1048052.
159. Orozco-Mosqueda, M. del C.; Glick, B.R.; Santoyo, G. ACC deaminase in plant growth-promoting bacteria (PGPB): An efficient mechanism to counter salt stress in crops. *Microbiol. Res.* **2020**, *235*, 126439, doi:10.1016/j.micres.2020.126439.
160. Khoso, M.A.; Wagan, S.; Alam, I.; Hussain, A.; Ali, Q.; Saha, S.; Poudel, T.R.; Manghwar, H.; Liu, F. Impact of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on plant nutrition and root characteristics: Current perspective. *Plant Stress* **2024**, *11*, 100341, doi:10.1016/j.stress.2023.100341.

161. Taylor, J.L.; Zaharia, L.I.; Chen, H.; Anderson, E.; Abrams, S.R. Biotransformation of adenine and cytokinins by the rhizobacterium *Serratia proteamaculans*. *Phytochemistry* **2006**, *67*, 1887–1894, doi:10.1016/j.phytochem.2006.06.016.
162. Nascimento, F.X.; Glick, B.R.; Rossi, M.J. Multiple plant hormone catabolism activities: an adaptation to a plant-associated lifestyle by *Achromobacter* spp. *Environ. Microbiol. Rep.* **2021**, *13*, 533–539, doi:10.1111/1758-2229.12987.
163. Pereira, L.C.; Bertuzzi Pereira, C.; Correia, L.V.; Matera, T.C.; Santos, R.F. dos; Carvalho, C. de; Osipi, E.A.F.; Braccini, A.L. Corn Responsiveness to *Azospirillum*: Accessing the Effect of Root Exudates on the Bacterial Growth and Its Ability to Fix Nitrogen. *Plants* **2020**, *9*, 923, doi:10.3390/plants9070923.
164. Sun, W.; Shahrajabian, M.H.; Wang, N. A Study of the Different Strains of the Genus *Azospirillum* spp. on Increasing Productivity and Stress Resilience in Plants. *Plants* **2025**, *14*, 267, doi:10.3390/plants14020267.
165. Zhou, X.; Zhang, J.; Khashi u Rahman, M.; Gao, D.; Wei, Z.; Wu, F.; Dini-Andreote, F. Interspecific plant interaction via root exudates structures the disease suppressiveness of rhizosphere microbiomes. *Mol. Plant* **2023**, *16*, 849–864, doi:10.1016/j.molp.2023.03.009.
166. Popržen, T.; Nikolić, I.; Krstić-Milošević, D.; Uzelac, B.; Trifunović-Momčilov, M.; Marković, M.; Radulović, O. Characterization of the IAA-Producing and -Degrading *Pseudomonas* Strains Regulating Growth of the Common Duckweed (*Lemna minor* L.). *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 17207, doi:10.3390/ijms242417207.
167. Anugrah, F.A.; Fanany, R.; Putra, S.A.; Masita, R.; Safitri, D.Y. Indole acetic acid (IAA) hormone production by endophytic bacteria isolate from Cinchona plant (*Cinchona ledgerina* Moens.) root.; 2021; p. 030082.
168. Duca, D.; Lorv, J.; Patten, C.L.; Rose, D.; Glick, B.R. Indole-3-acetic acid in plant–microbe interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek* **2014**, *106*, 85–125, doi:10.1007/s10482-013-0095-y.
169. Voko, M.P.; Aremu, A.O.; Makunga, N.P.; Nisler, J.; Doležal, K.; Masondo, N.A. The potential applications of cytokinins and cytokinin oxidase/dehydrogenase inhibitors for mitigating abiotic stresses in model and non-model plant species. *Curr. Plant Biol.* **2024**, *40*, 100398, doi:10.1016/j.cpb.2024.100398.
170. Swarnalakshmi, K.; Yadav, V.; Tyagi, D.; Dhar, D.W.; Kannepalli, A.; Kumar, S. Significance of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Grain Legumes: Growth Promotion and Crop Production. *Plants* **2020**, *9*, 1596, doi:10.3390/plants9111596.
171. El-Tohamy, W.A.; Dasgan, H.Y.; Gruda, N.S. Impact of Gibberellic Acid on Water Status, Growth, and Development of Cape Gooseberry in Newly Reclaimed Sandy Lands within Arid Regions. *Horticulturae*

- 2023**, *9*, 1283, doi:10.3390/horticulturae9121283.
172. Pan, C.; Tan, S.N.; Yong, J.W.H.; Ge, L. Progress and development of analytical methods for gibberellins. *J. Sep. Sci.* **2017**, *40*, 346–360, doi:10.1002/jssc.201600857.
 173. Camara, M.C.; Vandenberghe, L.P.S.; Rodrigues, C.; de Oliveira, J.; Faulds, C.; Bertrand, E.; Soccol, C.R. Current advances in gibberellic acid (GA3) production, patented technologies and potential applications. *Planta* **2018**, *248*, 1049–1062, doi:10.1007/s00425-018-2959-x.
 174. Fahde, S.; Boughribil, S.; Sijilmassi, B.; Amri, A. Rhizobia: A Promising Source of Plant Growth-Promoting Molecules and Their Non-Legume Interactions: Examining Applications and Mechanisms. *Agriculture* **2023**, *13*, 1279, doi:10.3390/agriculture13071279.
 175. Sah, S.K.; Reddy, K.R.; Li, J. Absciscic Acid and Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, doi:10.3389/fpls.2016.00571.
 176. Yuzikhin, O.S.; Gogoleva, N.E.; Shaposhnikov, A.I.; Konnova, T.A.; Osipova, E. V.; Syrova, D.S.; Ermakova, E.A.; Shevchenko, V.P.; Nagaev, I.Y.; Shevchenko, K. V.; et al. Rhizosphere Bacterium *Rhodococcus* sp. PIY Metabolizes Absciscic Acid to Form Dehydrovomifoliol. *Biomolecules* **2021**, *11*, 345, doi:10.3390/biom11030345.
 177. Egamberdieva, D.; Wirth, S.J.; Alqarawi, A.A.; Abd_Allah, E.F.; Hashem, A. Phytohormones and Beneficial Microbes: Essential Components for Plants to Balance Stress and Fitness. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, doi:10.3389/fmicb.2017.02104.
 178. Patel, K.; Goswami, D.; Dhandhukia, P.; Thakker, J. Techniques to Study Microbial Phytohormones. In; 2015; pp. 1–27.
 179. Shahid, M.; Singh, U.B.; Khan, M.S.; Singh, P.; Kumar, R.; Singh, R.N.; Kumar, A.; Singh, H. V. Bacterial ACC deaminase: Insights into enzymology, biochemistry, genetics, and potential role in amelioration of environmental stress in crop plants. *Front. Microbiol.* **2023**, *14*, doi:10.3389/fmicb.2023.1132770.
 180. Khan, M.T.; Aleinikovienė, J.; Butkevičienė, L.-M. Innovative Organic Fertilizers and Cover Crops: Perspectives for Sustainable Agriculture in the Era of Climate Change and Organic Agriculture. *Agronomy* **2024**, *14*, 2871, doi:10.3390/agronomy14122871.
 181. Lopes, M.J. dos S.; Dias-Filho, M.B.; Gurgel, E.S.C. Successful Plant Growth-Promoting Microbes: Inoculation Methods and Abiotic Factors. *Front. Sustain. Food Syst.* **2021**, *5*, doi:10.3389/fsufs.2021.606454.
 182. Saad, M.M.; Eida, A.A.; Hirt, H. Tailoring plant-associated microbial inoculants in agriculture: a roadmap for successful application. *J. Exp. Bot.* **2020**, *71*, 3878–3901, doi:10.1093/jxb/eraa111.
 183. Ali, S.; Akhtar, M.S.; Siraj, M.; Zaman, W. Molecular Communication

- of Microbial Plant Biostimulants in the Rhizosphere Under Abiotic Stress Conditions. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 12424, doi:10.3390/ijms252212424.
184. Nam, J.-H.; Shin, J.-H.; Lee, J.-Y.; Lee, D.-H. Effects of ionizing and ultraviolet radiation on microbial mutation and DNA damage. *Korean J. Microbiol.* **2017**, *53*, 20–28, doi:10.7845/kjm.2017.7004.
 185. Wang, T.; Cao, X.; Chen, M.; Lou, Y.; Wang, H.; Yang, Q.; Pan, H.; Zhuge, Y. Effects of Soil Acidification on Bacterial and Fungal Communities in the Jiaodong Peninsula, Northern China. *Agronomy* **2022**, *12*, 927, doi:10.3390/agronomy12040927.
 186. Ulbrich, T.C.; Rivas-Ubach, A.; Tiemann, L.K.; Friesen, M.L.; Evans, S.E. Plant root exudates and rhizosphere bacterial communities shift with neighbour context. *Soil Biol. Biochem.* **2022**, *172*, 108753, doi:10.1016/j.soilbio.2022.108753.
 187. Kochhar, N.; I.K, K.; Shrivastava, S.; Ghosh, A.; Rawat, V.S.; Sodhi, K.K.; Kumar, M. Perspectives on the microorganism of extreme environments and their applications. *Curr. Res. Microb. Sci.* **2022**, *3*, 100134, doi:10.1016/j.crmicr.2022.100134.
 188. Abou Jaoudé, R.; Ficca, A.G.; Luziatelli, F.; Ruzzi, M. Effect of the Inoculation Method on the Potential Plant Growth-Promoting Activity of a Microbial Synthetic Consortium. *Appl. Sci.* **2024**, *14*, 10797, doi:10.3390/app142310797.
 189. Afridi, M.S.; Kumar, A.; Javed, M.A.; Dubey, A.; de Medeiros, F.H.V.; Santoyo, G. Harnessing root exudates for plant microbiome engineering and stress resistance in plants. *Microbiol. Res.* **2024**, *279*, 127564, doi:10.1016/j.micres.2023.127564.
 190. Sokolova, E.A.; Mishukova, O.V.; Hlistun, I.V.; Tromenschleger, I.N.; Tikunov, A.Y.; Manakhov, A.D.; Rogaev, E.I.; Savenkov, O.A.; Buyanova, M.D.; Ivanov, I.V.; et al. The Effectiveness of Co-Inoculation by Consortia of Microorganisms Depends on the Type of Plant and the Soil Microbiome. *Plants* **2023**, *13*, 116, doi:10.3390/plants13010116.
 191. dos Santos Lopes, M.J.; Dias Filho, M.B.; dos Reis Castro, T.H.; de Filippi, M.C.C.; da Silva, G.B. Effect of *Pseudomonas fluorescens* and *Burkholderia pyrrocinia*; on the Growth Improvement and Physiological Responses in *Brachiaria brizantha*. *Am. J. Plant Sci.* **2018**, *09*, 250–265, doi:10.4236/ajps.2018.92021.
 192. O’Callaghan, M. Microbial inoculation of seed for improved crop performance: issues and opportunities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *100*, 5729–5746, doi:10.1007/s00253-016-7590-9.
 193. Jeyanthi, V.; Kanimozhi, S. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) - Prospective and Mechanisms: A Review. *J. Pure Appl. Microbiol.* **2018**, *12*, 733–749, doi:10.22207/JPAM.12.2.34.
 194. Koskey, G.; Mburu, S.W.; Awino, R.; Njeru, E.M.; Maingi, J.M. Potential Use of Beneficial Microorganisms for Soil Amelioration,

- Phytopathogen Biocontrol, and Sustainable Crop Production in Smallholder Agroecosystems. *Front. Sustain. Food Syst.* **2021**, *5*, doi:10.3389/fsufs.2021.606308.
195. Blouin, M.; Jacquiod, S. Sampling the control bulk soil for rhizosphere and drilosphere microbial studies. *Geoderma* **2020**, *380*, 114674, doi:10.1016/j.geoderma.2020.114674.
 196. Barillot, C.D.C.; Sarde, C.-O.; Bert, V.; Tarnaud, E.; Cochet, N. A standardized method for the sampling of rhizosphere and rhizoplan soil bacteria associated to a herbaceous root system. *Ann. Microbiol.* **2013**, *63*, 471–476, doi:10.1007/s13213-012-0491-y.
 197. Martí, E.; Càliz, J.; Montserrat, G.; Garau, M.A.; Cruañas, R.; Vila, X.; Sierra, J. Air-Drying, Cooling and Freezing for Soil Sample Storage Affects the Activity and the Microbial Communities from Two Mediterranean Soils. *Geomicrobiol. J.* **2012**, *29*, 151–160, doi:10.1080/01490451.2010.530341.
 198. Food and Agriculture Organization of the United Nations *Standard operating procedure for soil pH determination*; 2021;
 199. Paz-Ferreiro, J.; Vázquez, E.V.; de Abreu, C.A. Phosphorus Determination after Mehlich 3 Extraction and Anion Exchange Resin in an Agricultural Soil of Northwestern Spain. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **2012**, *43*, 102–111, doi:10.1080/00103624.2012.634688.
 200. Kerven, G.L.; Menzies, N.W.; Geyer, M.D. Analytical methods and quality assurance. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **2000**, *31*, 1935–1939, doi:10.1080/00103620009370551.
 201. Sáez-Plaza, P.; Navas, M.J.; Wybraniec, S.; Michałowski, T.; Asuero, A.G. An Overview of the Kjeldahl Method of Nitrogen Determination. Part II. Sample Preparation, Working Scale, Instrumental Finish, and Quality Control. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2013**, *43*, 224–272, doi:10.1080/10408347.2012.751787.
 202. Fatma Basyoni Salem. Determination of Phosphate in Water Samples. *Rev. Anal. Chem.* **1996**, *15*, 225–236.
 203. Grolamys Castillo, A.T.C.N.G.M.J.S.-B. and M.A. Simultaneous quantification of phytohormones in fermentation extracts of *Botryodiplodia theobromae* by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *30*, 1937–1946.
 204. Beck, H.E.; Zimmermann, N.E.; McVicar, T.R.; Vergopolan, N.; Berg, A.; Wood, E.F. Present and future Köppen–Geiger climate classification maps at 1-km resolution. *Sci. Data* **2018**, *5*, 180214, doi:10.1038/sdata.2018.214.
 205. Gediminas Straugautis, A.M.L.Ž. Dirvožemio organinės anglies (humuso) tyrimai žemės ūkio naudmenose. *LAMMC Žemdirbystės Inst. Agrochem. Tyrim. Lab.* **2022**, 1–30.
 206. Gediminas Staugaitis, L.Ž.A.M. Dirvožemio agrocheminiai tyrimai: fosforo kiekiai labai skiriasi. *MANO ŪKIS* **2022**.

207. Gediminas Straugautis, A.M.L.Ž. Dirvožemio agrocheminiai tyrimai: kalio augalams reikia daug. *MANO ŪKIS* **2022**.
208. Gediminas Straugautis, A.M.L.Ž. Mineralinio azoto tyrimai optimizuoja augalų mitybą. *MANO ŪKIS* **2022**.
209. Dastogeer, K.M.G.; Tumpa, F.H.; Sultana, A.; Akter, M.A.; Chakraborty, A. Plant microbiome—an account of the factors that shape community composition and diversity. *Curr. Plant Biol.* **2020**, *23*, 100161, doi:10.1016/j.cpb.2020.100161.
210. Xu, Y.; Li, J.; Qiao, C.; Yang, J.; Li, J.; Zheng, X.; Wang, C.; Cao, P.; Li, Y.; Chen, Q. Rhizosphere bacterial community is mainly determined by soil environmental factors, but the active bacterial diversity is mainly shaped by plant selection. *BMC Microbiol.* **2024**, *24*, 450, doi:10.1186/s12866-024-03611-y.
211. Hakim, S.; Naqqash, T.; Nawaz, M.S.; Laraib, I.; Siddique, M.J.; Zia, R.; Mirza, M.S.; Imran, A. Rhizosphere Engineering With Plant Growth-Promoting Microorganisms for Agriculture and Ecological Sustainability. *Front. Sustain. Food Syst.* **2021**, *5*, doi:10.3389/fsufs.2021.617157.
212. Shade, A.; Jacques, M.-A.; Barret, M. Ecological patterns of seed microbiome diversity, transmission, and assembly. *Curr. Opin. Microbiol.* **2017**, *37*, 15–22, doi:10.1016/j.mib.2017.03.010.
213. Bulgarelli, D.; Schlaeppi, K.; Spaepen, S.; van Themaat, E.V.L.; Schulze-Lefert, P. Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2013**, *64*, 807–838, doi:10.1146/annurev-arplant-050312-120106.
214. Amankona, S.; Kabenomuhangi, R. Regenerative Agriculture and Soil Health: Enhancing Biodiversity through Sustainable Farming Practices. *Int. J. Res. Publ. Rev.* **2024**, *5*, 3203–3215, doi:10.55248/gengpi.5.0924.2678.
215. Chen, Q.; Song, Y.; An, Y.; Lu, Y.; Zhong, G. Soil Microorganisms: Their Role in Enhancing Crop Nutrition and Health. *Diversity* **2024**, *16*, 734, doi:10.3390/d16120734.
216. Gorpenchenko, T.Y.; Sidorenko, M.L.; Kim, A. V.; Vologzhanina, Y. V.; Rusakova, D.A.; Timofeeva, Y.O.; Perepelkina, P.A.; Kazarin, V.M.; Zhuravlev, Y.N. Changes in the Composition and Properties of Cultured Bacterial Strains of Ginseng Rhizosphere According to Soil Characteristics in the Forest and Plots. *Agronomy* **2024**, *14*, 3019, doi:10.3390/agronomy14123019.
217. Ducousso-Détrez, A.; Lahrach, Z.; Fontaine, J.; Lounès-Hadj Sahraoui, A.; Hijri, M. Cultural techniques capture diverse phosphate-solubilizing bacteria in rock phosphate-enriched habitats. *Front. Microbiol.* **2024**, *15*, doi:10.3389/fmicb.2024.1280848.
218. Rodríguez-Caballero, G.; Caravaca, F.; Alguacil, M.M.; Fernández-López, M.; Fernández-González, A.J.; Roldán, A. Striking alterations in the soil bacterial community structure and functioning of the

- biological N cycle induced by *Pennisetum setaceum* invasion in a semiarid environment. *Soil Biol. Biochem.* **2017**, *109*, 176–187, doi:10.1016/j.soilbio.2017.02.012.
219. Zhang, B.; Wu, X.; Tai, X.; Sun, L.; Wu, M.; Zhang, W.; Chen, X.; Zhang, G.; Chen, T.; Liu, G.; et al. Variation in Actinobacterial Community Composition and Potential Function in Different Soil Ecosystems Belonging to the Arid Heihe River Basin of Northwest China. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, doi:10.3389/fmicb.2019.02209.
 220. Younas, H. Secondary metabolites from marine epiphytic bacteria against plant pathogens. In *Bacterial Secondary Metabolites*; Elsevier, 2024; pp. 353–379.
 221. Grzyb, T.; Szulc, J. Deciphering Molecular Mechanisms and Diversity of Plant Holobiont Bacteria: Microhabitats, Community Ecology, and Nutrient Acquisition. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 13601, doi:10.3390/ijms252413601.
 222. Harirchi, S.; Sar, T.; Ramezani, M.; Aliyu, H.; Etemadifar, Z.; Nojoumi, S.A.; Yazdian, F.; Awasthi, M.K.; Taherzadeh, M.J. *Bacillales*: From Taxonomy to Biotechnological and Industrial Perspectives. *Microorganisms* **2022**, *10*, 2355, doi:10.3390/microorganisms10122355.
 223. Krivoruchko, A.; Kuyukina, M.; Ivshina, I. Advanced *Rhodococcus* Biocatalysts for Environmental Biotechnologies. *Catalysts* **2019**, *9*, 236, doi:10.3390/catal9030236.
 224. Amogou, O.; P. Noumavo, A.; A. Agbodjato, N.; Sina, H.; Dagbénonbakin, G.; Y. Adoko, M.; K. Salako, V.; Glèlè Kakaï, R.; Adjanohoun, A.; Baba-Moussa, L. Rhizobacterial inoculation in combination with mineral fertilizer improves maize growth and yield in poor ferruginous soil in center of Benin. *BioTechnologia* **2021**, *102*, 141–155, doi:10.5114/bta.2021.106520.
 225. Timofeeva, A.M.; Galyamova, M.R.; Sedykh, S.E. Plant Growth-Promoting Soil Bacteria: Nitrogen Fixation, Phosphate Solubilization, Siderophore Production, and Other Biological Activities. *Plants* **2023**, *12*, 4074, doi:10.3390/plants12244074.
 226. Kuhl, T.; Chowdhury, S.P.; Uhl, J.; Rothballer, M. Genome-Based Characterization of Plant-Associated *Rhodococcus qingshengii* RL1 Reveals Stress Tolerance and Plant–Microbe Interaction Traits. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, doi:10.3389/fmicb.2021.708605.
 227. Pereira, S.I.A.; Castro, P.M.L. Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance *Zea mays* growth in agricultural P-deficient soils. *Ecol. Eng.* **2014**, *73*, 526–535, doi:10.1016/j.ecoleng.2014.09.060.
 228. Gómez-Godínez, L.J.; Aguirre-Noyola, J.L.; Martínez-Romero, E.; Arteaga-Garibay, R.I.; Ireta-Moreno, J.; Ruvalcaba-Gómez, J.M. A Look at Plant-Growth-Promoting Bacteria. *Plants* **2023**, *12*, 1668, doi:10.3390/plants12081668.
 229. Meenakshi, S.; Hiremath, J.; Meenakshi, M.H.; Shivaveerakumar, S.

- Actinomycetes: Isolation, Cultivation and its Active Biomolecules. *J. Pure Appl. Microbiol.* **2024**, *18*, 118–143, doi:10.22207/JPAM.18.1.48.
230. Mousavi, S.A.; Willems, A.; Nesme, X.; de Lajudie, P.; Lindström, K. Revised phylogeny of *Rhizobiaceae*: Proposal of the delineation of *Pararhizobium* gen. nov., and 13 new species combinations. *Syst. Appl. Microbiol.* **2015**, *38*, 84–90, doi:10.1016/j.syapm.2014.12.003.
 231. Marañón, G.; Kondorosi, Á. Nitrogen-fixing *Rhizobium*-legume symbiosis: are polyploidy and host peptide-governed symbiont differentiation general principles of endosymbiosis? *Front. Microbiol.* **2014**, *5*, doi:10.3389/fmicb.2014.00326.
 232. Wang, Q.; Liu, J.; Zhu, H. Genetic and Molecular Mechanisms Underlying Symbiotic Specificity in Legume-*Rhizobium* Interactions. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, doi:10.3389/fpls.2018.00313.
 233. Debnath, S.; Das, A.; Maheshwari, D.K.; Pandey, P. Treatment with atypical rhizobia, *Pararhizobium giardinii* and *Ochrobactrum* sp. modulate the rhizospheric bacterial community, and enhances *Lens culinaris* growth in fallow-soil. *Microbiol. Res.* **2023**, *267*, 127255, doi:10.1016/j.micres.2022.127255.
 234. Haruta, S.; Kanno, N. Survivability of Microbes in Natural Environments and Their Ecological Impacts. *Microbes Environ.* **2015**, *30*, 123–125, doi:10.1264/jsme2.ME3002rh.
 235. Wu, X.; Liu, Y.; Jia, B.; Tao, L.; Li, H.; Wang, J.; Yuan, Z.; Sun, X.; Yao, Y. Four Decades of *Bacillus* Biofertilizers: Advances and Future Prospects in Agriculture. *Microorganisms* **2025**, *13*, 187, doi:10.3390/microorganisms13010187.
 236. Liu, X.; Li, Q.; Li, Y.; Guan, G.; Chen, S. *Paenibacillus* strains with nitrogen fixation and multiple beneficial properties for promoting plant growth. *PeerJ* **2019**, *7*, e7445, doi:10.7717/peerj.7445.
 237. Figueiredo, M.V.B.; Burity, H.A.; Martínez, C.R.; Chanway, C.P. Alleviation of drought stress in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by co-inoculation with *Paenibacillus polymyxa* and *Rhizobium tropici*. *Appl. Soil Ecol.* **2008**, *40*, 182–188, doi:10.1016/j.apsoil.2008.04.005.
 238. Korir, H.; Mungai, N.W.; Thuita, M.; Hamba, Y.; Masso, C. Co-inoculation Effect of Rhizobia and Plant Growth Promoting Rhizobacteria on Common Bean Growth in a Low Phosphorus Soil. *Front. Plant Sci.* **2017**, *08*, doi:10.3389/fpls.2017.00141.
 239. Olanrewaju, O.S.; Babalola, O.O. *Streptomyces*: implications and interactions in plant growth promotion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *103*, 1179–1188, doi:10.1007/s00253-018-09577-y.
 240. Tian, X.; Hu, L.; Jia, R.; Cao, S.; Sun, Y.; Dong, X.; Wang, Y. *Streptomyces pratensis* S10 Promotes Wheat Plant Growth and Induces Resistance in Wheat Seedlings against *Fusarium graminearum*. *J. Fungi* **2024**, *10*, 578, doi:10.3390/jof10080578.

241. Shan, H.; Wen, H.; Zhang, J.; Wang, Y.; Lu, L.; Liu, Y.; Yang, B.; Ji, W. Synergistic Role of *Streptomyces* Composite Inoculants in Mitigating Wheat Drought Stress Under Field Conditions. *Plants* **2025**, *14*, 366, doi:10.3390/plants14030366.
242. Khan, S.; Srivastava, S.; Karnwal, A.; Malik, T. *Streptomyces* as a promising biological control agents for plant pathogens. *Front. Microbiol.* **2023**, *14*, doi:10.3389/fmicb.2023.1285543.
243. Breitzkreuz, C.; Buscot, F.; Tarkka, M.; Reitz, T. Shifts Between and Among Populations of Wheat Rhizosphere *Pseudomonas*, *Streptomyces* and *Phyllobacterium* Suggest Consistent Phosphate Mobilization at Different Wheat Growth Stages Under Abiotic Stress. *Front. Microbiol.* **2020**, *10*, doi:10.3389/fmicb.2019.03109.
244. Ayaz, M.; Ali, Q.; Jiang, Q.; Wang, R.; Wang, Z.; Mu, G.; Khan, S.A.; Khan, A.R.; Manghwar, H.; Wu, H.; et al. Salt Tolerant *Bacillus* Strains Improve Plant Growth Traits and Regulation of Phytohormones in Wheat under Salinity Stress. *Plants* **2022**, *11*, 2769, doi:10.3390/plants11202769.
245. Lyng, M.; Kovács, Á.T. Frenemies of the soil: *Bacillus* and *Pseudomonas* interspecies interactions. *Trends Microbiol.* **2023**, *31*, 845–857, doi:10.1016/j.tim.2023.02.003.
246. Amri, M.; Rjeibi, M.R.; Gatrouni, M.; Mateus, D.M.R.; Asses, N.; Pinho, H.J.O.; Abbes, C. Isolation, Identification, and Characterization of Phosphate-Solubilizing Bacteria from Tunisian Soils. *Microorganisms* **2023**, *11*, 783, doi:10.3390/microorganisms11030783.
247. Grady, E.N.; MacDonald, J.; Liu, L.; Richman, A.; Yuan, Z.-C. Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. *Microb. Cell Fact.* **2016**, *15*, 203, doi:10.1186/s12934-016-0603-7.
248. Pan, L.; Cai, B. Phosphate-Solubilizing Bacteria: Advances in Their Physiology, Molecular Mechanisms and Microbial Community Effects. *Microorganisms* **2023**, *11*, 2904, doi:10.3390/microorganisms11122904.
249. Ibarra-Galeana, J.A.; Castro-Martínez, C.; Fierro-Coronado, R.A.; Armenta-Bojórquez, A.D.; Maldonado-Mendoza, I.E. Characterization of phosphate-solubilizing bacteria exhibiting the potential for growth promotion and phosphorus nutrition improvement in maize (*Zea mays* L.) in calcareous soils of Sinaloa, Mexico. *Ann. Microbiol.* **2017**, *67*, 801–811, doi:10.1007/s13213-017-1308-9.
250. Mohd Din, A.R.J.; Rosli, M.A.; Mohamad Azam, Z.; Othman, N.Z.; Sarmidi, M.R. *Paenibacillus polymyxa* Role Involved in Phosphate Solubilization and Growth Promotion of *Zea mays* Under Abiotic Stress Condition. *Proc. Natl. Acad. Sci. India Sect. B Biol. Sci.* **2020**, *90*, 63–71, doi:10.1007/s40011-019-01081-1.
251. Karonji, S.; Odhiambo, N.O.; Muli, J.K.; Mugweru, J.; Mwirichia, R. Control of Alternaria Leaf Spot of the Common Bean (*Phaseolus*

- vulgaris* L.) Using Soil-Derived Biological Agents. *Scientifica (Cairo)*. **2024**, 2024, 1–9, doi:10.1155/2024/3896663.
252. Xing, P.; Zhao, Y.; Guan, D.; Li, L.; Zhao, B.; Ma, M.; Jiang, X.; Tian, C.; Cao, F.; Li, J. Effects of *Bradyrhizobium* Co-Inoculated with *Bacillus* and *Paenibacillus* on the Structure and Functional Genes of Soybean Rhizobacteria Community. *Genes (Basel)*. **2022**, 13, 1922, doi:10.3390/genes13111922.
 253. Chouyia, F.E.; Ventrino, V.; Pepe, O. Diversity, mechanisms and beneficial features of phosphate-solubilizing *Streptomyces* in sustainable agriculture: A review. *Front. Plant Sci.* **2022**, 13, doi:10.3389/fpls.2022.1035358.
 254. Olanrewaju, O.S.; Babalola, O.O. *Streptomyces*: implications and interactions in plant growth promotion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, 103, 1179–1188, doi:10.1007/s00253-018-09577-y.
 255. Wang, Z.; Zhang, H.; Liu, L.; Li, S.; Xie, J.; Xue, X.; Jiang, Y. Screening of phosphate-solubilizing bacteria and their abilities of phosphorus solubilization and wheat growth promotion. *BMC Microbiol.* **2022**, 22, 296, doi:10.1186/s12866-022-02715-7.
 256. Sánchez, S.; Chávez, A.; Forero, A.; García-Huante, Y.; Romero, A.; Sánchez, M.; Rocha, D.; Sánchez, B.; Ávalos, M.; Guzmán-Trampe, S.; et al. Carbon source regulation of antibiotic production. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **2010**, 63, 442–459, doi:10.1038/ja.2010.78.
 257. Watthanasakphub, N.; Nguyen, L. Van; Cheng, Y.-S.; Show, P.-L.; Sriariyanun, M.; Koffas, M.; Rattanaporn, K. Development of a Molasses-Based Medium for *Agrobacterium tumefaciens* Fermentation for Application in Plant-Based Recombinant Protein Production. *Fermentation* **2023**, 9, 149, doi:10.3390/fermentation9020149.
 258. Zohri, A.E.-N.; Soliman, M.; Ibrahim, O.; Abdelaziz, A. Reducing heavy metals content in sugarcane molasses and its effect on ethanol fermentation efficiency. *Egypt. Sugar J.* **2022**, 18, 60–67, doi:10.21608/esugj.2022.143054.1011.
 259. Acosta-Piantini, E.; Rodríguez-Díez, E.; Chavarri, M.; López-de-Armentia, I.; Villaran, M.C.; Lombraña, J.I. Preparation of Hydrolyzed Sugarcane Molasses as a Low-Cost Medium for the Mass Production of Probiotic *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* F19. *Separations* **2023**, 10, 33, doi:10.3390/separations10010033.
 260. Fu, Y. Yeast extract as a more sustainable food ingredient: Insights into flavor and bioactivity. In; 2025; pp. 97–147.
 261. Rochmaningsih; Harismah, K.; Mulyaningtyas, A. Optimization of Peptone Production from Soybeans.; 2022.
 262. Kaziūnienė, J.; Mažylytė, R.; Krasauskas, A.; Toleikienė, M.; Gegeckas, A. Optimizing the Growth Conditions of the Selected Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria *Paenibacillus* sp. MVY-024 for Industrial Scale Production. *Biology (Basel)*. **2022**, 11, 745,

- doi:10.3390/biology11050745.
263. Shanmugam, K.T.; Valentine, R.C. Microbial production of ammonium ion from nitrogen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1975**, *72*, 136–139, doi:10.1073/pnas.72.1.136.
 264. Regueira-Marcos, L.; García-Depraet, O.; Muñoz, R. Elucidating the role of pH and total solids content in the co-production of biohydrogen and carboxylic acids from food waste via lactate-driven dark fermentation. *Fuel* **2023**, *338*, 127238, doi:10.1016/j.fuel.2022.127238.
 265. Gonzalez, J.M.; Santana, M.M.; Gomez, E.J.; Delgado, J.A. Soil Thermophiles and Their Extracellular Enzymes: A Set of Capabilities Able to Provide Significant Services and Risks. *Microorganisms* **2023**, *11*, 1650, doi:10.3390/microorganisms11071650.
 266. Gauvry, E.; Mathot, A.-G.; Leguérinel, I.; Couvert, O.; Postollec, F.; Broussolle, V.; Coroller, L. Knowledge of the physiology of spore-forming bacteria can explain the origin of spores in the food environment. *Res. Microbiol.* **2017**, *168*, 369–378, doi:10.1016/j.resmic.2016.10.006.
 267. Cho, W.-I.; Chung, M.-S. *Bacillus* spores: a review of their properties and inactivation processing technologies. *Food Sci. Biotechnol.* **2020**, *29*, 1447–1461, doi:10.1007/s10068-020-00809-4.
 268. Berg, G.; Smalla, K. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2009**, *68*, 1–13, doi:10.1111/j.1574-6941.2009.00654.x.
 269. Laishram, B.; Devi, O.R.; Dutta, R.; Senthilkumar, T.; Goyal, G.; Paliwal, D.K.; Panotra, N.; Rasool, A. Plant-microbe interactions: PGPM as microbial inoculants/biofertilizers for sustaining crop productivity and soil fertility. *Curr. Res. Microb. Sci.* **2025**, *8*, 100333, doi:10.1016/j.crmicr.2024.100333.
 270. Sani, M.N.H.; Islam, M.N.; Uddain, J.; Chowdhury, M.S.N.; Subramaniam, S. Synergistic effect of microbial and nonmicrobial biostimulants on growth, yield, and nutritional quality of organic tomato. *Crop Sci.* **2020**, *60*, 2102–2114, doi:10.1002/csc2.20176.
 271. Nosheen, S.; Ajmal, I.; Song, Y. Microbes as Biofertilizers, a Potential Approach for Sustainable Crop Production. *Sustainability* **2021**, *13*, 1868, doi:10.3390/su13041868.
 272. Shi, X.; Zhao, Y.; Xu, M.; Ma, L.; Adams, J.M.; Shi, Y. Insights into plant–microbe interactions in the rhizosphere to promote sustainable agriculture in the new crops era. *New Crop.* **2024**, *1*, 100004, doi:10.1016/j.ncrops.2023.11.002.
 273. Xiao, H.; Sheng, H.; Zhang, L.; Zhang, L.; Pan, B.; Zhou, P. How does land-use change alter soil microbial diversity, composition, and network in subtropical China? *CATENA* **2023**, *231*, 107335, doi:10.1016/j.catena.2023.107335.

274. Yang, C.-X.; Chen, S.-J.; Hong, X.-Y.; Wang, L.-Z.; Wu, H.-M.; Tang, Y.-Y.; Gao, Y.-Y.; Hao, G.-F. Plant exudates-driven microbiome recruitment and assembly facilitates plant health management. *FEMS Microbiol. Rev.* **2025**, *49*, doi:10.1093/femsre/fuaf008.
275. Rigobelo, E.C.; de Andrade, L.A.; Santos, C.H.B.; Frezarin, E.T.; Sales, L.R.; de Carvalho, L.A.L.; Guariz Pinheiro, D.; Nicodemo, D.; Babalola, O.O.; Verdi, M.C.Q.; et al. Effects of *Trichoderma harzianum* and *Bacillus subtilis* on the root and soil microbiomes of the soybean plant INTACTA RR2 PROTM. *Front. Plant Sci.* **2024**, *15*, doi:10.3389/fpls.2024.1403160.
276. Hafez, M.; Popov, A.I.; Rashad, M. The Biological Correction Using Humic Substances, Vermicompost, and *Azospirillum* as an Optimum Way of Optimizing Plant Production and Enhancing Soil Micronutrients in Arid Regions. *Open Agric. J.* **2022**, *16*, doi:10.2174/18743315-v16-e2204180.
277. Crowther, T.W.; Rappuoli, R.; Corinaldesi, C.; Danovaro, R.; Donohue, T.J.; Huisman, J.; Stein, L.Y.; Timmis, J.K.; Timmis, K.; Anderson, M.Z.; et al. Scientists' call to action: Microbes, planetary health, and the Sustainable Development Goals. *Cell* **2024**, *187*, 5195–5216, doi:10.1016/j.cell.2024.07.051.
278. Kapinusova, G.; Lopez Marin, M.A.; Uhlik, O. Reaching unreachables: Obstacles and successes of microbial cultivation and their reasons. *Front. Microbiol.* **2023**, *14*, doi:10.3389/fmicb.2023.1089630.
279. Bharti, N.; Suryavanshi, M. Quality control and regulations of biofertilizers: Current scenario and future prospects. In *Biofertilizers*; Elsevier, 2021; pp. 133–141.
280. Neuhoﬀ, D.; Neumann, G.; Weinmann, M. Testing plant growth promoting microorganisms in the field - a proposal for standards. *Front. Plant Sci.* **2024**, *14*, doi:10.3389/fpls.2023.1324665.
281. Mishra, A.K.; Sudalaimuthuasari, N.; Hazzouri, K.M.; Saeed, E.E.; Shah, I.; Amiri, K.M.A. Tapping into Plant–Microbiome Interactions through the Lens of Multi-Omics Techniques. *Cells* **2022**, *11*, 3254, doi:10.3390/cells11203254.

UŽRAŠAMS

UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius
El. p. info@leidykla.vu.lt, www.leidykla.vu.lt
bookshop.vu.lt, journals.vu.lt
Tiražas 15 egz.