

Влияние на комбинираната употреба на минерален тор и микробиални инокуланти върху свойствата на почвата, добива и качеството на тютюн Бърлей

Радка Божинова*, Цвета Христова

Институт по тютюна и тютюневите изделия, 4108 Марково

E-mail*: rbojinova@yahoo.com

Резюме

Проучено е влиянието на три микробиални инокуланти Europlus® (Италия), Micotric L® (Италия) и Rhizo-Vam Basic® (Германия), приложени в комбинация с минерален азотен тор, върху агрохимичните и биологичните свойства на почвата, усвояването на хранителните елементи, продуктивността и качеството на тютюн Бърлей. Всички микробиални продукти съдържат арбускуларни микоризни гъби от род *Glomus*. Изследването е проведено при полски условия върху Хумусно-карбонатна почва (Rendzic Leptosol). Опитът е заложен по блоков метод, в три повторения.

Установено е, че изпитаните микробиални продукти се отразяват положително върху свойствата на почвата, с по-слабо изразен ефект върху агрохимичните отколкото върху биологичните. Под тяхно влияние средната популационна плътност в ризосферните микробни съобщества значително се увеличава, като промените засягат основно трофични групи почвени микроорганизми, свързани с трансформациите на азотните съединения в почвата, по-специално процесите на амонификация и имобилизация на минерален азот. Комбинираното прилагане на микробиалните продукти с азотен минерален тор, осигурява по-благоприятен азотен режим в почвата, отколкото самостоятелното минерално торене и като цяло те подобряват усвояването на основни хранителни елементи от тютюневите растения. Съдържанието на макроелементите (N, P, K, Ca и Mg), както и на микроелементите Zn и Cu в тютюневите листа нараства при тяхната употреба. Микробиалните инокуланти повишават стопанския добив и качеството на суровината. Най-висок добив сух тютюн е получен при продуктите Rhizo-Vam Basic и Micotric L, а суровина с най-високо качество при продуктите Europlus и Micotric L. От стопанска гледна точка най-подходящ като биотор при отглеждането на тютюн Бърлей е продуктът Micotric L. Под негово влияние добивът нараства със 7%, а качеството на суровината с 37%. Степента на колонизация на корените с арбускуларни микоризни гъби и установените положителни статистически значими корелационни зависимости със съдържанието на макроелементи в тютюневите растения показват, че изпитваните микробиални продукти успешно могат да се използват при разработване на екологосъобразни технологии за отглеждане на тютюн Бърлей.

Ключови думи: биоторове, АМГ, свойства на почва, микрофлора, хранителни елементи, тютюн Бърлей

Impact of the combined use of chemical fertilizer and microbial inoculants on soil properties, yield and quality of Burley tobacco

Radka Bozhinova*, Tsveta Hristeva

Tobacco and Tobacco Products Institute, 4108 Markovo, Bulgaria

Corresponding author*: rbojinova@yahoo.com

Citation: Bozhinova, R., & Hristeva, Ts. (2022). Impact of the combined use of chemical fertilizer and microbial inoculants on soil properties, yield and quality of Burley tobacco. *Bulgarian Journal of Soil Science Agrochemistry and Ecology*, 56(1), 17-33.

Abstract

The effects of three commercial microbial inoculants Europlus® (Italy), Micotric L® (Italy) and Rhizo-Vam Basic® (Germany), applied in combination with mineral nitrogen fertilizer, on the soil agrochemical and biological properties, absorption of nutrients, yield and quality of Burley tobacco were studied in field experiment set on Rendzic Leptosol. The microbial products contain arbuscular mycorrhizal fungi of the genus *Glomus*. The experimental design was a randomized complete block replicated three times.

It was found that the tested microbial products had a positive effect on soil properties, with less definite on agrochemical than on biological properties. The average population density in the rhizosphere microbial communities increased significantly under their influence. The changes affected mainly the trophic groups of soil microorganisms which performed the processes of ammonification and immobilization of mineral nitrogen. The combined application of microbial products with mineral nitrogen fertilizer provided a more favorable nitrogen regime in the soil than self-mineral fertilization and improved the absorption of basic nutrients by tobacco plants in general. Microbial products increased the content of macronutrients (N, P, K, Ca and Mg) in tobacco. The concentration of Zn and Cu in the leaves also increased with their use. Microbial inoculants increased the yield and the quality of the dry tobacco. The highest yield was obtained with the products Rhizo-Vam Basic and Micotric L, and the highest quality with the products Europlus and Micotric L. Micotric L was the most suitable bio-fertilizer for Burley tobacco from agricultural aspect. The yield increased by 7% and the quality of the tobacco raw material by 37%. The degree of root colonization with arbuscular mycorrhizal fungi and the established positive statistically significant correlations with the content of macronutrients in tobacco plants showed that the tested microbial products can be successfully used in the development of environmental-friendly technologies for Burley tobacco cultivation.

Key words: bio-fertilizers, arbuscular mycorrhizal fungi, soil properties, microbiota, nutrients, Burley tobacco

Въведение

Торенето е незаменимо мероприятие за постигане на максимален стопански ефект в земеделието, но прекомерната употреба на минерални торове във времето е с доказани сериозни негативни въздействия върху екосистемите и почвеното плодородие (Ongley et al., 2010; Philippot et al., 2013; Wagg et al., 2014). Необходимостта от ограничаване на тяхното използване налага прилагането на нови алтернативни средства, които да осигуряват оптимален хранителен режим, растеж и развитие на културите, да гарантират получаването на устойчиви добиви и да са безопасни за околната среда (Strickland et al., 2009; Mahanty et al., 2016; Pii et al., 2015; Mitter et al., 2021; Pirttilä et al., 2021). Възможности в това отношение предлагат микроорганизмите осъществяващи естествените процеси на кръговрат на веществата (Duhamel & Vandenkoornhuysе, 2013; Mahanty et al., 2016; Pii et al., 2015), като фокусът през последните години е насочен не само към ризосферата, но и към целия холобионт на растенията (Bargaz et al., 2018; Mitter et al., 2021; Riaz et al., 2021). Микробниалните продукти (биоторове, биостимулатори, средства за биоконтрол) съдържат живи бактерии и/или гъбички. За тяхното разработване към момента се използват около 50 функционални щама микробни тактони (Naik et al., 2019). Биоторовете са основно на базата на стимулиращи растежа на растенията ризобактерии (PGPR) и арбускуларни микоризни гъби (АМГ) самостоятелно или в комбинации, които внесени в почвата успешно колонизират ризосферата, ризоплана или осъществяват симбиотична връзка с корените (Adesemoye et al., 2008; Bhardwaj et al., 2014). Процесите, които извършват като разграждане на органичните съединения, окисляване, разтваряне на труднодостъпни хранителни елементи (N, P, K), на азотфиксация, производство на хормони, сидерофори, хидролитични ензими, антибиотици и прочие, подобряват храненето и здравния статус на растенията и като цяло свойствата на почвата в дългосрочен план (Fiorentino et al., 2018; Ipsilantis et al., 2018;

Verma et al., 2018). Проучванията в тази насока непрекъснато се разширяват, разкриват се нови функции и механизми на взаимодействия в растителния микробиом, които увеличават възможностите за тяхното използване в земеделието (Benami et al., 2020; Maçik et al., 2020; Mitter et al., 2021; Pirttilä et al., 2021). Въпреки големия си екологичен потенциал, растящото предлагане и търсене, биоторовете не могат да заменят изцяло конвенционалните такива. Причините, ограничаващи широката им употреба са свързани с редица фактори, но основният е непоследователността в проявата на агрономическият им ефект при различните земеделски култури в условията на полево валидиране (Owen et al., 2015; Mitter et al., 2021). Това налага задълбочени познания за характерните особености както на биоинокулантите, така и на микробните общности при отделните култури и конкретни условия на отглеждането им. Рационално решение за оптимално хранене на растенията са системите за балансирано торене, които интегрират комбинирана употреба на неорганични и органични торове, на биоторове и биостимуланти, съобразно спецификата на всяка култура (Chen, 2006; Leoni et al., 2019).

Тютюните от сортова група Бърлей, за разлика от Ориенталските и Виржинските, реагират положително на интензивно минерално торене (Arsov, 1985; Ruggiero et al., 2004; Vozhina, 2017; Zou et al., 2017). Сравнително високите дози минерални торове, които се използват при отглеждането на тютюн от тази сортова група се явяват потенциален източник на замърсяване на околната среда. В аспект устойчиво производство на тютюн са необходими проучвания за реакцията на трите типа тютюни отглеждани в България към биоторове, ефективността и възможностите за включването им в технологичните схеми на торене.

Целта на изследването беше да се проучи влиянието на различни микробниални инокуланти, приложени в комбинация с минерален азотен тор, върху агрохимичните и биологичните свойства на почвата, усвояването на хранителни

елементи, продуктивността и качеството на тютюн Бърлей.

Материали и методи

Проучването е проведено в условия на полски експеримент с три търговски микробиални продукта, с качества на биоторове.

Характеристика на използваните микробиални продукти

- Europlus[®], производител EUROVIX, Италия – комбиниран продукт, който съдържа спори от арбускуларни микоризни гъби от р. *Glomus* – 2% и полезни ризосферни бактерии (*Bacillus spp.* - плътност $1,2 \times 10^9$ CFU/g).

- Micotric L[®], производител EUROVIX, Италия - комбиниран продукт, който съдържа спори от арбускуларни микоризни гъби от р. *Glomus* - 0,2%; спори от почвени микроскопични гъби от р. *Trichoderma* (плътност $6,0 \times 10^7$ CFU/g); комплекс от полезни ризосферни бактерии (плътност $1,2 \times 10^5$ CFU/g); ензими произведени от микроорганизми със стимулиращо и синергично действие (хитиназа, хитобиозидаза, глюконаза, β -1,3-глюкозидаза, глюкозаминаза, ксиланаза и други), суспендирани в течна органична материя.

- Rhizo-Vam Basic[®], Германия - съдържа размножителен материал (спори и хифи) само от един вид АМГ - *Glomus intraradices*, запечатани в глинени гранулки с размер 2-4 mm.

Опитна постановка

Опитът е заложен върху хумусно-карбонатна почва (Rendzic Leptosol), по блоков метод, в три повторения, с големина на опитната парцела $22,0 \text{ m}^2$. За индикаторен сорт е използван сорт Бърлей 1317. Тютюнът е разсаден при междуредово разстояние 110 cm и вътрередово - 40 cm ($2250 \text{ plants.da}^{-1}$). Отгледан е по възприетата за тази сортова група тютюни технология. На цялата площ непосредствено след разсаждане е приложено минерално торене с азотен тор (под форма на амониева селитра) в норма $8,0 \text{ kg N.da}^{-1}$.

Микробиалните инокуланти са внесени една седмица след разсаждането на тютюна, на дълбочината на кореновата система в следните дози: Europlus – $0,4 \text{ g/plant}$, Micotric L – $4,4 \text{ ml/}$

plant и Rhizo-Vam Basic – $13,3 \text{ g/plant}$.

Вариантите на проучването са:

V0 – $8,0 \text{ kg N.da}^{-1}$ (контрола, без микробиален тор);

V1 – $8,0 \text{ kg N.da}^{-1}$ + Europlus;

V2 – $8,0 \text{ kg N.da}^{-1}$ + Micotric L;

V3 – $8,0 \text{ kg N.da}^{-1}$ + Rhizo-Vam Basic.

Агрохимични и растителни анализи

Проби за агрохимични анализи са взети от почвения слой 0-25 cm преди разсаждането (месец май) и от всеки вариант през вегетацията, по време на масовия цъфтеж на тютюна (края на месец юли). Определено е съдържанието на минерален азот (NH_4^+ и NO_3^-) – чрез дестилация и редукция на нитратите, подвижен фосфор – по Олсен, усвоим калий – в 2 N HCl и реакция на почвата – $\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}}$ - потенциометрично. На почвените проби, взети през вегетацията на тютюна, са определени и подвижните форми на Ca и Mg - в извлек от 1 N KCl. За извличане на подвижното желязо, манган, цинк и мед от почвата е използван разтвор на 0,005 M ДТРА + 0,1 M ТЕА, pH = 7,3. Отчитането е направено на атомно-абсорбционен спектрометър.

На растителни проби от технически зрели листа от среден беритбен пояс на тютюна е определено съдържанието на макро- и микроелементи: общ азот - по Келдал; фосфор по молибдат-ванадатния метод; съдържание на K, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn и Cu с използване на атомно-абсорбционен спектрометър. Подготовката на растителните проби за определяне съдържанието на P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn и Cu е извършена чрез сухо изгаряне и разтваряне на пепелта в 3 M HCl.

Биометрични и стопански показатели

През вегетацията са снети данни за височината на тютюна, броя листа на растение (във фаза масов цъфтеж), размерите и материалността на технически зрели листа от среден беритбен пояс. Отчетен е добивът сух тютюн (kg.da^{-1}) и процентното му разпределение по класи.

Микробиологични анализи

За микробиологичен анализ на почвата са взети проби от ризосферата на тютюневите растения във фаза масов цъфтеж. Анализите са извършени чрез посяване на разредени почвени

суспензии върху специфични хранителни среди, в три повторения, по метода на Koch. Определени са количествата на следните трофични групи почвени микроорганизми: Актиномицети – върху скорбяло-амонячен агар; Микромицети/Микроскопични гъбички – върху Чапек агар; Бактерии усвояващи минерален N - върху скорбяло-амонячен агар; Амонифициращи бактерии - върху месо-пептонен агар. Количествата са изчислени като брой колонии образувани/g абсолютно суха почва (CFU/g a.d.s.), при ниво на достоверност $p \geq 0,95$ (Grudeva et al., 2006). Изчислен е минерализационно-имобилизационният индекс /МИИ/ - като съотношение между численостите на бактериите усвояващи минерален N към численостите на амонифициращите бактерии.

Определен е % на колонизация на корените на тютюна от арбускуларни микоризни гъби (АМГ) спрямо общата дължина на корените. Колонизацията на корените с АМГ е определена по метода на пресичане на мрежови линии по Giovannetti & Mosse (1980), под стереомикроскоп, след оцветяване на корените с 0,05% трипан-блу в съответствие с процедурата на Koske & Gemma (1989).

Статистическа обработка

Обработката на данните е извършена с помощта на статистическия пакет PSPP for Windows. За определяне ефекта от микробиалните продукти са приложени корелационен и вариационен анализ, и тест за многопосочно сравняване на резултатите по Duncan при ниво на вероятност 0,05. За определяне доказаността на разликите между отделните варианти е използван и дисперсионен анализ.

Резултати и обсъждане

Агрохимична характеристика

Резултатите от почвения анализ показват, че почвата преди разсаждането на тютюна (месец май) е със слабо алкална реакция - $pH_{H_2O} = 8,04$, ниско съдържание на минерален азот – 12,64 mg.kg⁻¹, слаба запасеност с подвижен фосфор – 2,18 mg.100 g⁻¹ и с добра запасеност по отношение на усвоимия калий – 46,32 mg.100 g⁻¹.

С напредване на вегетацията на тютюна, при всички варианти е регистрирано намаляване на минералния азот в почвата спрямо съдържанието му преди разсаждането, средно с 39,87%. Най-значимо е намалението при неинокулираната с биоторове контрола – 62,03%, а най-слабо при третиране с продукта Micotric L – 10,6%. В сравнение с контролата стойностите при инокулираните с микробиални продукти варианти са завишени, по-забележимо при третирането с Micotric L (фиг. 1a). Процентното увеличение при продукта Europlus е с 60,42%, при Micotric L със 135,42% и с 37,5% при продукта Rhizo-Vam Basic. Нивата на подвижен фосфор, през вегетацията слабо се повишават под влияние на биоинокулантите, въпреки че при всички изпитвани варианти почвата остава в категорията на слабо запасените (фиг. 1b). Най-ясно изразено е увеличението при третиране с Europlus – 41%-42%, както спрямо изходното съдържание в почвата, така и спрямо неинокулираната контрола. Увеличението при останалите два биопродукта е между 9% и 14%. Съдържанието на подвижния калий в почвата практически остава непроменено през вегетацията на тютюна. Промените под влияние прилагането на биоторовете са несъществени (фиг. 1c), но в посока увеличаване от порядъка на 1,30% – 1,94% при продуктите Europlus и Rhizo-Vam Basic. По-значимо е увеличението под влияние на продукта Micotric L – 8,64%.

Въпреки че количествата на макроелементите в почвата не са завишени значимо, разликите в съдържанието им под влияние на микробиалните инокуланти са в съответствие с получени резултати при други култури, за увеличаване достъпността на основните хранителни елементи в почвата (Wu et al., 2005; Lin et al., 2020). При тютюневата култура са докладвани положителни въздействия на микробиални торове върху храненето, добива и качеството на тютюн Виржиния (Cheng et al., 2012); повишаване съдържанието на N_{min} и на подвижните P и K в почвата при използване на продукта Micotric L, през определени периоди от вегетацията на ориенталски тютюн (Bozhinova & Hristeva, 2018); увеличаване достъпността на

фосфора и калия в почвата, и подобряване на качеството на суровината при прилагането на минерален тор в комбинация с АМГ и калий-мобилизиращата бактерия *Frateria aurantia* (Subhashini, 2016).

Изпитаните микробиални продукти не са довели до диференциация в съдържанието на подвижните Са и Mg в почвата по варианти (таблица 1). Отчетените стойности в съдържанието на подвижния калций при микробиалните варианти е занижено спрямо контролата, като варирането е слабо - VC = 4,4%. Намалението е по-осезаемо при варианта с Europlus – 9,73%. При останалите два варианта е в рамките на 2,13% и 3,42%. Влиянието на микробиалните продукти върху съдържанието на подвижния магнезий също е слабо - VC е 6,5% и разнопосочно. Намаление спрямо контролата е отчетено при продукта Micotric L – 6,19%, а повишаване при продуктите Europlus (с 9,34%) и Rhizo-Vam Basic (с 4,51%).

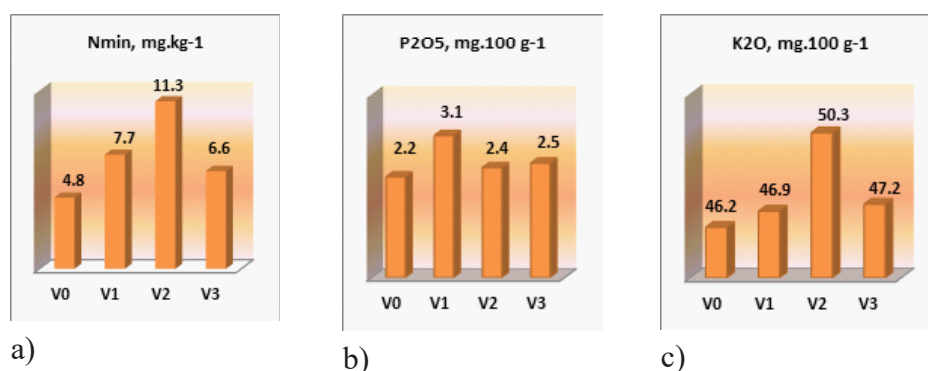
Според O'Hallorans et al. (2004) железен дефицит при карбонатни почви, какъвто е типът почва в настоящето изследване, може да настъпи при съдържание на усвоимо желязо (извлек с ДТРА) по-ниско от 4,5 mg.kg⁻¹. В почвата от контролния вариант съдържанието на желязо е близко до тази стойност. При вариантите с микробиални инокуланти стойностите са високи. Регистрираното увеличение спрямо контролата при варианта с Europlus е 58,3%, при Micotric L – 28,22% и при Rhizo-Vam Basic – 9,54%. Подобна е тенденцията и при съдържанието на манган в почвата (VC = 16,22%). Увеличението е съответно с 42,86% при Europlus, с 12,24% при Micotric L и с 7,87% при Rhizo-Vam Basic. Не са установени отчетливи различия между вариантите и нетретираната контрола в съдържанието на подвижен цинк и мед в почвата. Вариационните коефициенти са ниски и задвата елемента (за Zn - VC=4,73%; за Cu – VC=2,35%). При Zn се наблюдава известно увеличаване спрямо контролата след третирането с микробиалните продукти: при Europlus с 8,14%, при Micotric L с 5,95% и при Rhizo-Vam Basic с 12,05%.

При изследване проведено в централна

Гърция с тютюн Бърлей, с цел установяване на зависимости между концентрациите на подвижните форми на тежките метали в почвата и нивата им на натрупване в тютюневите листа, са посочени следните средни стойности за Mn – 23,5 mg.kg⁻¹, за Zn – 1,1 mg.kg⁻¹, а за Cu – от 0,3 до 6,2 mg.kg⁻¹ почва (Golia et al., 2009). В този аспект, количествата на подвижния цинк и мед в изследваната почва като цяло са завишени, но внасянето на микробиалните инокуланти не увеличава нивата им до стойности, които да представляват екологичен риск. Доказано е, че както бактериите, стимулиращи растежа на растенията (PGPB), така и арбускуларните микоризни гъби могат да се използват за улесняване на процеса на фиторемедиация и намаляване на стреса на растенията от тежкометално замърсяване на почвите (Hildebrandt et al., 2007; Ferrol et al., 2016).

Микробиологична характеристика на почвата

Трите микробиални продукта променят популационната плътност на изследваните трофични групи почвени микроорганизми (таблица 2). Под тяхно въздействие количествата на микромицетите и актиномицетите като цяло намаляват спрямо контролата. Процентният ефект на депресия е представен на фигура 2 и 3. При групата на микромицетите най-слаба редукция в плътността е отчетена при варианта с внасяне на Micotric L (-10,08%). При групата на актиномицетите по-силно депресиращо влияние се наблюдава при варианта с Europlus (-25,24%). Вероятната причина за наблюдаваното въздействие при тези два продукта е техният състав. Двата продукта са комбинирани и освен спори и хифи на АМГ съдържат и други почвени микроорганизми. Продуктът Micotric L съдържа спори на микроскопични гъбички от род *Trichoderma*, а Europlus спори на хетеротрофни бактерии от род *Bacillus*, за които е известно че проявяват антагонистично действие срещу различни таксони микроорганизми (Colla et al., 2015; Fiorentino et al., 2018; Guo et al., 2019). Интродуцирането им в ризосферата съответно променя плътността на посочените трофични групи и се отразява на популационното разнообразие в микробните съобщества, тъй като



Фиг. 1. Съдържание на а) минерален азот (mg.kg⁻¹), б) подвижен фосфор (mg.100 g⁻¹) и в) подвижен калий (mg.100 g⁻¹) в почвата, през вегетацията на тютюна (месец юли)

Fig. 1. Content a) Soil mineral nitrogen (mg.kg⁻¹), b) available P₂O₅ content (mg.100 g⁻¹) and c) available K₂O content (mg.100 g⁻¹) during the tobacco vegetation (in July)

Таблица 1. Подвижни форми на елементите в почвата
Table 1. Available element content in the soil

Вариант/ Treatment	Ca	Mg	Fe	Mn	Zn	Cu
				mg.100 g ⁻¹		
V0 - N8, контрола/control - without microbial inoculant	370,9	22,60	4,82	17,15	6,39	11,33
V1 - N8+Europlus	334,8	24,71	7,63	24,50	6,91	10,98
V2 - N8+Micotric L	363,0	21,20	6,18	19,25	6,77	11,58
V3 - N8+Rhizo- Vam Basic	358,2	23,62	5,28	18,50	7,16	11,50
VC, %	4,35	6,49	20,71	16,22	4,73	2,35

те се явяват индигенни за останалите членове на ризосферната микробна популация и променят установените естествени взаимоотношения. Сведенията за промените в микоризосферните съобщества в резултат от използването на подобни комбинирани микробиални продукти при различни култури са разнопосочни - от положително и отрицателно до неутрално въздействие. Например, съобщенията за комбинацията от *G. intraradices*

и микроскопичната гъбичка от род *Trichoderma*, както е продуктът Micotric, са за намаляване плътността на почвени актиномицети и G(+) бактерии в ризосферата на домати (Hodge & Storer, 2015). Подобни зависимости, обаче не се наблюдават в ризосферата на царевица (Smith & Smith, 2011).

Другите две изследвани трофични групи микроорганизми са свързани с трансформацията на

азотните съединения в почвата – амонифициращи и усвояващи/имобилизиращи минерален азот. Количествата им са увеличени под влияние на микробниалните продукти (фиг. 2). Продуктът Europlus силно увеличава плътността на амонифициращите микроорганизми. Увеличението спрямо контролата е 128,51%. Продуктът Micotric L влияе по-силно върху групата на имобилизиращите минерален азот и увеличава популационната им плътност със 76,61%. Продуктът Rhizo-Vam Basic, който не е комбиниран и съдържа само *G. intraradices* също стимулира численото развитие и на двете трофични групи, свързани с динамиката на азота. Увеличението при амонифициращите микроорганизми е 58,94%, а при имобилизиращите минерален азот – 28,5%. За достъпността на усвоимите от растенията азотни йони от значение е структурното равновесие между двете групи микроорганизми в ризосферата, числен израз на което са стойностите на минерализационно-имобилизационен индекс. Резултатите показват, че определените стойности са оптимални за съответната фаза от развитието на тютюневите растения и по-благоприятни за азотния режим в почвата отколкото този при варианта торен само с минерален азотен тор (таблица 2). Относителният дял на амонифициращите микроорганизми в микробните съобщества формирани след инокулация с микробниалните продукти е увеличен и представлява от 41% до 52% от микробната общност.

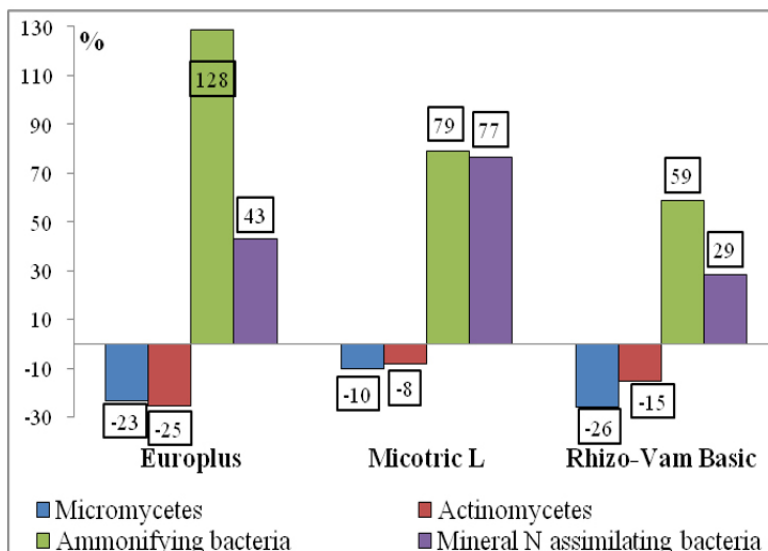
Като цяло и трите продукта стимулират численото развитие на микроорганизмите в ризосферата на тютюна. Средната популационна плътност в микробните съобщества е увеличена от порядъка на десетки милиони при варианта с Rhizo-Vam Basic ($80,09 \times 10^6/g$ абс. суха почва) и със стотици милиони при вариантите с Europlus и Micotric L ($153,0 \times 10^6/g$ абс. суха почва) (фиг. 3).

Между плътността при някои от трофичните групи микроорганизми и съдържанието на подвижните форми на основни макроелементи в почвата са установени корелационни зависимости.

Съдържанието на азот е в много силна статистически доказана, положителна зависимост с численостите на бактериите усвояващи минерален азот $P99\%$ ($R = 0,990 \geq R_{\text{крит.}} 0,834$) и значителна с численостите на амонифициращите бактерии ($R = 0,563$). При останалите две групи микроорганизми стойностите на корелационния коефициент са ниски, отрицателни (за микромицети $R = -0,140$ и за актиномицети $R = -0,188$), статистически незначими. Количествата на всички трофични групи микроорганизми са в корелационни зависимости със съдържанието на фосфор в почвата. Много силни, доказани при високо ниво на достоверност са регистрирани при амонифициращите микроорганизми - положителна $P99\%$ ($R = 0,905$) и отрицателна при актиномицетите $P99\%$ ($R = -0,956$). При микромицетите зависимостта е силна и отрицателна, доказана при $P95\%$ ($R = -0,717 \geq R_{\text{крит.}} 0,707$). При групата на усвояващите минерален азот бактерии зависимостта е слаба и не се доказва статистически ($R = 0,288$). Плътността на бактериите усвояващи минерален азот е в статистически доказана зависимост със съдържанието на калий в почвата $P99\%$ ($R = 0,911$). При групата на амонифициращите микроорганизми зависимостта е слаба и недостоверна ($R = 0,298$). При останалите групи микроорганизми не е наблюдавана зависимост със съдържанието на калий в почвата.

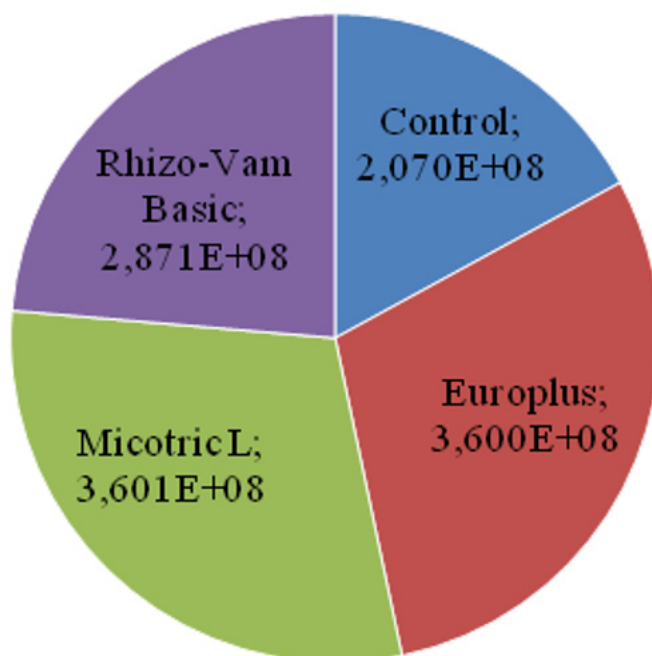
Съдържание на макроелементи в тютюна

Изпитаните микробниални инокулати повишават съдържанието на макроелементите (N, P, K, Ca, Mg) в листата от средния беритбен пояс на тютюн Бърлей, който е основен при формиране на тютюневата суровина (таблица 3). Установената концентрация на азот в технически зрелите листа варира от 3,18% до 3,9% и е най-ниска при контролата. Увеличението спрямо контролата при вариантите третирани с Europlus (22,64%) и Micotric L (11,64%) е статистически доказано. При варианта с използване на Rhizo-Vam Basic повишаването в съдържанието на азота е с 9,43%, без да се доказва статистически.



Фиг. 2. Ефект на микробналните продукти върху плътността на трофичните групи микроорганизми – изразен като % спрямо контролата

Fig. 2. Effect of microbial products on the density of trophic groups of microorganisms - expressed as % relative to control



Фиг. 3. Средна популационна плътност (CFU/g а.с.п.) в микробните съобщества при прилагане на микробналните продукти

Fig. 3. Average population density (CFU/g a.d.s.), in the microbial communities in the application of microbial products

Таблица 2. Влияние на микробиалните препарати върху популационната плътност (CFU/g а.с.п.) на изследваните трофични групи почвени микроорганизми и относителен дял (%) в микробните общности в ризосферата на тютюн Бърлей

Table 2. Effect of microbial inoculants on population density (CFU/g a.d.s.) of the studied trophic groups of soil microorganisms and relative share (%) at the microbial community in the rhizosphere of Burley tobacco

Трофични групи микроорганизми Trophic groups of microorganisms Treatments	Микромицети/ Micro-mycetes	Актиномицети/ Actinomycetes	Амонифициращи бактерии/ Ammonifying bacteria	Бактерии усвояващи минерален N/ Mineral N assimilating bacteria	МИИ/МП
N8, without microbial inoculant density/share	28,242x10 ³ 0,0034%	35,222x10 ⁶ 4,254%	327,880x10 ⁶ 39,596%	464,928x10 ⁶ 56,147%	1,418
N8+Europlus density/share	21,666x10 ³ 0,0015%	26,330 x10 ⁶ 1,829%	749,236x10 ⁶ 52,032%	664,375x10 ⁶ 46,138%	0,887
N8+Micotric L density/share	25,395x10 ³ 0,0018%	32,433 x10 ⁶ 2,252	586,777x10 ⁶ 40,739%	721,111x10 ⁶ 57,01%	1,229
N8+Rhizo-Vam Basic density/share	20,967x10 ³ 0,0018%	29,862 x10 ⁶ 2,600%	521,119x10 ⁶ 45,376%	597,436x10 ⁶ 52,02%	1,146

Таблица 3. Съдържание на макроелементи в тютюн Бърлей

Table 3. Content of macronutrients in Burley tobacco leaves

Вариант/Treatment	N (%)	P (%)	K (%)	Ca (%)	Mg (%)
N8, without microbial inoculant	3,18 c*	0,20 b	1,31 c	2,69 c	0,48 b
N8+Europlus	3,90 a	0,28 a	1,56 b	3,49 b	0,58 ab
N8+Micotric L	3,55 b	0,27 a	1,84 a	3,94 a	0,63 a
N8+Rhizo-Vam Basic	3,48 bc	0,24 ab	1,60 b	3,75 a	0,54 ab
VC, %	8,38	14,24	13,76	15,87	11,38

* - Different letters within each column indicate that the means are significantly different (P<0,05)

Съдържанието на общ азот е свързан със съдържанието на никотин в листата и зависи освен от сортовете особености и от приложеното минерално торене. Според Vozhinova (2017) всяка единица торов азот повишава съдържанието на никотин в листата на тютюн Бърлей с 0,01%. При сравнително изпитване на над 16 български генотипи тютюн Бърлей концентрациите на общ азот варират между 2,48% и 3,91%, средно около 3,19%-3,41% (Dyulgierski, 2017; 2020). За сорт Бърлей 1317, който е използван в настоящето проучване посочената стойност за съдържание на общ азот е 2,74% (Dyulgierski, 2020). Трите микробиални продукта подобряват постъпването на азот като регистрираните концентрации са над средните за българските генотипи тютюн Бърлей. Микробиалните продукти повишават съдържанието на фосфор в листата. Отчетените абсолютни стойности в условията на опита са от 0,20% при контролния вариант до 0,24%-0,28% при вариантите с микробиални инокуланти. Процентното увеличение спрямо контролата е с 40% при Europlus, с 35% при Micotric L и с 20% при Rhizo-Vam Basic. Въпреки добрата запасеност с усвоим калий на почвата, върху която е заложен полският опит, концентрацията на елемента в листните тъкани като цяло е на ниско равнище. Според Evanylo et al. (1988) за получаване на качествен тютюн критичните нива при този елемент са от 3,48% до 4,81%. Отчетените стойности при всички варианти от опита са от 1,31% до 1,84%. Една от възможните причини за отчетеното ниско съдържание е високото съдържание на калций в този почвен тип, който е антагонист на калия и понижава усвояването му. Независимо от ниските абсолютни стойности микробиалните продукти доказано повишават съдържанието на калий. Най-осезаемо спрямо нетретираната контрола е увеличението при варианта третиран с Micotric L – 40,46%, следван от третирания с Rhizo-Vam Basic – 22,14% и с Europlus – 19,08%. Включените в изпитването биопродукти доказано увеличават съдържанието и на калция. Увеличението е най-високо при третиране с Micotric L – 46,47% и при Rhizo-Vam Basic – 39,41%, а при Eu-

roplus то е 29,74%. Процентното нарастване в съдържанието на магнезий е съответно: Micotric L – 31,25%, Europlus – 20,83% и Rhizo-Vam Basic – 12,5%.

Резултатите са в съответствие с известното от литературата, положително влияние на микробиални продукти на база АМГ върху азотното и фосфорното хранене на растенията, и увеличаване съдържанието на макроелементите при редица земеделски култури: царевица (Wu et al., 2005); житни (Zhang et al., 2019); люцерна (Stancheva et al., 2008; Petkova et al., 2021); зеленчуци (Colla et al., 2015; Fiorentino et al., 2018), декоративна растителност (Leoni et al., 2019; Lin et al., 2020) и други.

Химичният състав на сухия тютюн е определящ за неговите вкусово-пушателни качества. При изследване на качеството на тютюн Бърлей, произвеждан в различни региони на България, е установено, че българските тютюни Бърлей отговарят на типа по общо качество, но поради специфичните условия на отглеждане, в повечето случаи са с по-ниски качествени показатели от вносните (Drachev & Nikolova, 2014; Dyulgierski, 2020). При почвено-климатичните условия на щата Кентъки (САЩ) във връзка с определяне на оптимални норми на торене при интегрирана система за диагностика са установени критични стойности на концентрациите на основните хранителни вещества в листата на тютюн Бърлей (Evanylo et al., 1988; Henry et al., 2018). Според тези изследвания за получаване на оптимални добиви качествен тютюн Бърлей, със сравнително ниска себестойност, концентрациите на макроелементи в листата е необходимо да са в следните гранични стойности: N (4,38%-4,45%); P (0,24%-0,25%); K (3,48%-4,81%); Ca (3,33%-3,81%); Mg (0,48%-0,63%). Получените резултати показват, че при третиране с микробиалните продукти съдържанието на всички макроелементи, с изключение на калия, е близко до посочените гранични стойности за получаване на качествен тютюн Бърлей.

Съдържание на микроелементи в тютюна

Според Campbell (2000) референтните стойности за добра осигуреност с микроелементи

на тютюн Бърлей са: за Fe – 50-300 mg.kg⁻¹, за Mn – 20-250 mg.kg⁻¹; за Zn – 20-60 mg.kg⁻¹ и за Cu – 5-10 mg.kg⁻¹.

Получените данни от настоящето изследване (таблица 4) показват, че концентрацията на желязо в тютюневите листа при всички варианти е над посочената долна граница от 50 mg.kg⁻¹, като при вариантите с микробиални инокуланти е по-ниско от регистрираното при контролния вариант, независимо, че при тях съдържанието на Fe в почвата се повишава. Сведенията за ефекта на микоризната колонизация върху общото усвояване на Fe от растенията са променливи и непоследователни, като се счита че ефектът е по-значим основно при корените (Lehmann & Rillig, 2015). Въпреки сравнително добрата запасеност на почвата с подвижен манган, концентрацията му в листата (64,8-72,7 mg.kg⁻¹) е по-ниска от посочената горна гранична стойност от 250 mg.kg⁻¹. Този показател не се променя закономерно по варианти. Слабо увеличаване се наблюдава при варианта с Micotric L, а намаляване при варианта с Rhizo-Vam Basic. Вероятната причина е различния микробен състав на отделните биопродукти. Установено е, че усвояването на Mn е по-ниско в микоризни растения (Corgêa et al., 2014), но се съобщава и за случаи на по-високо поглъщане (Lehmann & Rillig, 2015). Предполага се, че тези разнопосочни ефекти се дължат на промяна в състава и активността на ризосферните микробни съобщества и по-конкретно на изобилието на Mn редуциращите микроорганизми (Kothari et al., 1991; Ferrol et al., 2016). Концентрацията на цинк в листата на тютюна (71,1-83,6 mg.kg⁻¹) превишава горната граница за добра осигуреност от 60 mg.kg⁻¹, като микробиалните продукти я завишават спрямо контролата. Високите стойности може да се припишат на значителното съдържание на подвижен Zn в почвата. Концентрацията на мед в листата варира от 21,3 до 26,4 mg.kg⁻¹, доказано най-ниска при контролата. Не са отчетени съществени разлики между отделните варианти с микробиални продукти. Микроелементите играят съществена роля в много биологични процеси, но са токсични

когато са в излишък. Счита се, че симбиозата с АМГ освен, че подобрява минералното хранене на растенията и допринася за усвояването на хранителни вещества с ниска подвижност, е един от ключовите елементи в подобряването на концентрациите на микроелементи в културите и намира приложение при фиторемедиацията (Hildebrandt et al., 2007).

Микоризна колонизация на корените на тютюн Бърлей

Резултатите от анализите показват, че тютюн Бърлей успешно встъпва в симбиотична връзка с арбускуларните микоризни гъби.

Растенията от контролния вариант са колонизирани от естествено съдържащи се в почвата спори на АМГ, като процентът на колонизация на корените е около 8% (фиг. 3 и 4). Внасянето на микробиалните продукти увеличава степента на колонизация над два пъти. Абсолютните стойности и при трите продукта са близки, но процента колонизирани корени е по-висок при комбинираните – Europlus и Micotric L (фиг. 3). Наблюдават се типичните за арбускуларна микоризна симбиоза структури – арбускули и везикури (фиг. 4).

Установени са силни и много силни корелационни зависимости между степента на колонизация с АМГ и популационната плътност в почвата на изследваните трофични групи микроорганизми: с микромицетите отрицателна, статистически значима при P95% ($R = -0,743 \geq R_{\text{крит.}} 0,707$); с актиномицетите също отрицателна, статистически значима при P95% ($R = -0,772$); с амонифициращите микроорганизми положителна, статистически значима при P99% ($R = 0,915 \geq R_{\text{крит.}} 0,834$); с имобилизиращите мин. N бактерии положителна, статистически значима при P99% ($R = 0,837$).

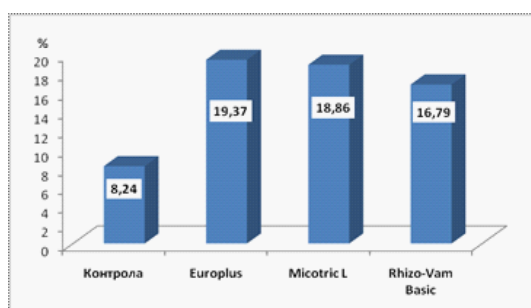
С подвижните форми на макроелементите в почвата статистически доказана положителна корелационна зависимост е регистрирана само със съдържанието на минерален азот при P95% ($R = 0,749$). Зависимостите със съдържанието на фосфор ($R = 0,682$) и калий ($R = 0,566$) са умерени без да са статистически достоверни.

Положителни статистически значими корелационни зависимости се установяват

Таблица 4. Съдържание на микроелементи в тютюн Бърлей
Table 4. Content of microelements in Burley tobacco leaves

Вариант/Treatment	Fe (mg.kg ⁻¹)	Mn (mg.kg ⁻¹)	Zn (mg.kg ⁻¹)	Cu (mg.kg ⁻¹)
N8, without microbial inoculant	95,8 a*	66,3 a	71,1 c	21,3 b
N8+Europlus	72,4 c	66,9 a	74,6 b	26,2 a
N8+Micotric L	82,4 b	72,7 a	79,9 ab	26,0 a
N8+Rhizo-Vam Basic	74,3 bc	64,8 a	83,6 a	26,4 a
VC, %	13,10	5,12	7,17	9,83

* - Different letters within each column indicate that the means are significantly different (P<0,05)



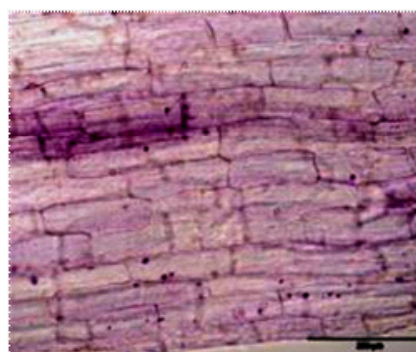
Фиг. 3. Степен на колонизация на корените на тютюн Бърлей с АМГ (%)

Fig. 3. Degree of colonization of Burley tobacco roots with AMF (%)

и между степента на колонизация с АМГ и съдържанието на макроелементи в тютюневите растения: със съдържанието на N при P99% (R=0,867); със съдържанието на фосфор при P99% (R=0,989); със съдържанието на калий при P95% (R=0,827); със съдържанието на калций P99% (R=0,900) и със съдържанието на магнезий при P99% (R=0,885).

Тези зависимости подкрепят установеното при други култури положително влияние на арбускуларната микоризна симбиоза върху минералното хранене на растенията (Colla et al., 2015; Bargaz et al., 2018; Zhang et al., 2019; Venami et al., 2020; Lin et al., 2020).

Биометрични и стопански показатели



Фиг. 4. Микоризирани корени на тютюн Бърлей – арбускули, везикули, спори (авторска снимка)

Fig. 4. Mycorrhizal roots of Burley tobacco - arbuscules, vesicles, spores (author's photo)

Ефектите на микробиалните продукти върху височините, броя, размерите и материалността на листата не са ясно изразени и са статистически неразличими (таблица 5).

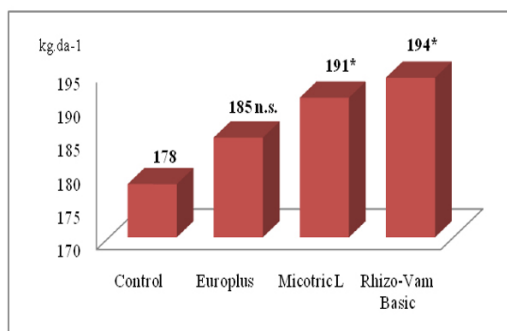
Варирането на биометричните показатели е слабо, с ниски стойности на вариационните коефициенти. Върху височината на растенията по-осезаемо е влиянието на продукта Micotric L, а върху размера на листата и тяхната материалност (съдържание на сухо вещество) - продукта Rhizo-Vam Basic.

Полученият стопански добив от тютюн Бърлей при варианта торен само с минерален азотен тор е 178 kg.da⁻¹ (фиг. 4). При комбинираното торене с микробиални продукти добивът сух

Таблица 5. Влияние на микробиалните препарати върху биометричните показатели и материалността на листата

Table 5. Influence of microbial inoculants on growth parameters and dry weight per unit leaf area

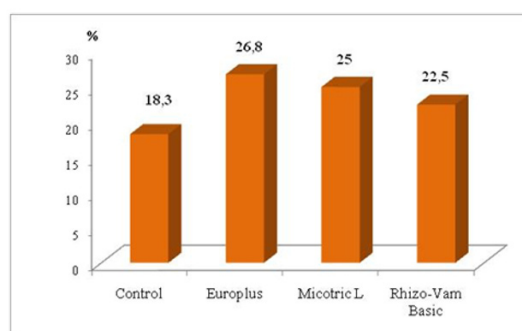
Вариант/Treatment	Височина/Height (cm)	Брой листа/Number of leaves	Размери на 14-ти лист/ Dimensions of 14 leaf (cm)		Материалност/ Dry weight per unit leaf area -14 leaf (g.100 cm ²)
			Дължина/Length	Ширина/Width	
N8, without microbial inoculant	166,7	27,0	61,0	32,6	0,432
N8+Europlus	168,6	27,1	62,6	33,5	0,426
N8+Micotric L	170,8	27,4	61,4	32,8	0,412
N8+Rhizo-Vam Basic	167,4	27,1	62,9	34,0	0,462
GD 5%	7,11	1,06	3,23	2,06	-
VC, %	1,07	0,64	1,48	1,94	4,87



Фиг. 4. Добив сух тютюн (kg.da⁻¹)

Fig. 4. Yield of cured leaves (kg.da⁻¹)

*- Significant at the 0.05 probability levels; n.s. – not significant



Фиг. 5. Качество на тютюн Бърлей (% I класа)

Fig. 5. Leaf quality of Burley tobacco (% of 1st grade)

тютюн нараства с 3,9% при внасяне на Europlus, със 7,3% при внасяне на Micotric L и с 9,0% при внасяне на Rhizo-Vam Basic. Разликите с контролата са доказани при вариантите с Micotric L и Rhizo-Vam Basic.

Изпитаните микробиални продукти са допринесли за повишаване на качеството на сухия тютюн (фиг. 5). С най-висок процент първа класа се отличава тютюнът от варианта с Europlus, следван от третирания с Micotric L. Увеличението спрямо контролата е с 46,45%

при Europlus, с 36,61% при Micotric L и с 22,95% при Rhizo-Vam Basic. Положителен ефект на микробиални продукти върху добива и качеството при тютюневата култура е установен и от други автори (Cheng et al., 2012; Vozhinova & Hristeva, 2018).

Заклучение

Изпитаните търговски микробиални продукти на база АМГ и PGPRB (Europlus, Micotric L и

Rhizo-Vam Basic) се отразяват положително върху свойствата на почвата, с по-слабо изразен ефект върху агрохимичните отколкото върху биологичните. Под тяхно влияние средната популационна плътност в ризосферните микробни съобщества значително се увеличава, като промените засягат основно трофични групи почвени микроорганизми, свързани с трансформациите на азотните съединения в почвата, по-специално процесите на амонификация и имобилизация на минерален азот.

Комбинираното прилагане на микробиалните продукти с азотен минерален тор, осигурява по-благоприятен азотен режим в почвата, отколкото самостоятелното минерално торене и като цяло те подобряват усвояването на основни хранителни елементи от тютюневите растения. Съдържанието на макроелементите (N, P, K, Ca и Mg), както и на микроелементите Zn и Cu в тютюневите листа нараства при тяхната употреба.

Микробиалните инокуланти повишават стопанския добив и качеството на суровината. Най-висок добив сух тютюн е получен при продуктите Rhizo-Vam Basic и Micotric L, а суровина с най-високо качество при продуктите Europlus и Micotric L. От стопанска гледна точка най-подходящ като биотор при отглеждането на тютюн Бърлей е продуктът Micotric L. Под негово влияние добивът нараства със 7%, а качеството на суровината с 37%.

Степента на колонизация на корените на тютюневите растения с арбускуларни микоризни гъби и установените положителни статистически значими корелационни зависимости със съдържанието на макроелементи в тях показват, че изпитваните микробиални продукти успешно могат да се използват при разработване на екологосъобразни технологии за отглеждане на тютюн Бърлей.

Благодарности

Настоящото изследване е финансирано по проект ДН 06/9, фонд „Научни изследвания“, конкурсна сесия „Фундаментални изследвания“, 2016 г., МОН.

Литература

- Adesemoye, A., Torbert, H. & Kloepper, J. (2008). Enhanced plant nutrient use efficiency with PGPR and AMF in an integrated nutrient management system. *Canadian Journal of Microbiology*, 54(10), 876–886.
- Arsov, K. (1985). Mineral fertilization and quality of Burley tobacco. *Bulgarian Tobacco*, 2, 27-31 (Bg).
- Bargaz, A., Lyamlouli, K., Chtouki, M., Zeroual, Y. & Dhiba, D. (2018). Soil microbial resources for improving fertilizers efficiency in an integrated plant nutrient management system. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1606.
- Benami, M., Isack, Y., Grotzky, D., Levy, D. & Kofman, Y. (2020) The economic potential of arbuscular mycorrhizal fungi in agriculture. In: Nevalainen H. (ed) *Grand Challenges in Fungal Biotechnology. Grand Challenges in Biology and Biotechnology*, Springer, Cham.
- Bhardwaj, D., Ansari, M.W., Sahoo, R.K. & Tuteja, N. (2014). Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. *Microbial Cell Factories*, 13(1), 66.
- Bozhinova, R. & Hristeva, T. (2018). Changes in the biological and agrochemical properties of soil and mineral composition of oriental tobacco depending on the fertilization with industrial microbiological product - Micotric L. *Bulgarian Journal of Soil Science, Agrochemistry and Ecology*, 52(4), 3-12.
- Bozhinova, R. (2017). Effect of nitrogen rate and foliar fertilization on yield, quality leaf chemistry in Burley tobacco. *Bulgarian Journal of Crop Science*, 54(2), 33-39.
- Campbell, C. (2000). *Reference sufficiency ranges field crops, tobacco, Burley*, www.ncagr.com/agronomi/saaesd/burley.htm
- Chen, J. (2006). The combined use of chemical and organic fertilizers and/or biofertilizer for crop growth and soil fertility. Proc. of International Workshop on Sustained Management of the Soil-Rhizosphere System for Efficient Crop Production and Fertilizer Use, Bangkok, 1-11.
- Cheng, J., Wu, Z., Yuan, L., Hong, S., Tao, H. & Long, Z. (2012). Effects of increasing application rate of microbial fertilizer on yield and internal quality of flue-cured tobacco. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 24(7), 63-66.
- Colla, G., Roupael, Y., Di Mattia, E., El-Nakhel, C. & Cardarelli, M. (2015). Co-inoculation of *Glomus intraradices* and *Trichoderma atroviride* acts as a biostimulant to promote growth, yield and nutrient uptake of vegetable crops. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(8), 1706–1715.
- Corrêa, A., Cruz, C., Pérez-Tienda, J. & Ferrol, N. (2014). Shedding light onto nutrient responses of arbuscular mycorrhizal plants: nutrient interactions may lead to unpredicted outcomes of the symbiosis. *Plant Science*, 221, 29–41.
- Drachev, D. & Nikolova, V. (2014). Comparative technological study of the tobacco of Burley variety group grown in Bulgaria. *Biotechnology & Biotechnological*

Equipment, 20(2), 191-200.

Duhamel, M. & Vandenkoornhuysse, P. (2013). Sustainable agriculture: possible trajectories from mutualistic symbiosis and plant neodomestication. *Trends in Plant Science*, 18(11), 597-600.

Dyulgerski, Y. (2017). Economical indicators and consumer parameters of new Burley tobacco lines, *Bulgarian Journal of Crop Science*, 54(2), 40-46.

Dyulgerski, Y. (2020). Biological, economic and chemical characteristic of perspective lines Burley tobacco. *Bulgarian Journal of Crop Science*, 57(6), 66-72.

Evanylo, G. K., Sims, J. L. & Grove, J. H. (1988). Nutrient norms for cured Burley Tobacco. *Agronomy Journal*, 80(4), 610-614.

Ferrol, N.I., Martínez Tamayo, E. & Vargas, P. (2016). The heavy metal paradox in arbuscular mycorrhizas: from mechanisms to biotechnological applications. *Journal of Experimental Botany*, 67(22), 6253-6265.

Fiorentino, N., Venterino, V., Woo, S.L., Pepe, O., De Rosa, A., Gioia, L., Romano, I., Lombardi, N., Napolitano, M., Colla, G. & Roupheal, Y. (2018). Trichoderma-based biostimulants modulate rhizosphere microbial populations and improve N uptake efficiency, yield, and nutritional quality of leafy vegetables. *Frontiers in Plant Science*, 9, 743.

Giovannetti, M. & Mosse, B. (1980). An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist*, 84(3), 489-500.

Golia, E. E., Dimirkou, A. & Mitsios, I. K. (2009). Heavy-metal concentration in tobacco leaves in relation to their available soil fractions. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 40(1), 106-120.

Grudeva, V., Moncheva, P., Naumova, S., Gocheva, B., Nedeva, T. & Antonova-Nikolova, S. (2006). *Manual of microbiology*. Univ. Ed. "St. Kliment Ohridski", Sofia (Bg).

Guo, Y., Ghirardo, A., Weber, B., Schnitzler, J. P., Benz, J. P. & Rosenkranz, M. (2019). Trichoderma species differ in their volatile profiles and in antagonism toward ectomycorrhizal *Laccaria bicolor*. *Frontiers in Microbiology*, 10, 891.

Henry, J., Vann, M., Mc Call, I., Cockson, P. & Whipker, B. E. (2018). Nutrient disorders of Burley and flue-cured tobacco: Part 1-Macronutrient deficiencies; Part 2-Micronutrient Disorders. *Crop, Forage & Turfgrass Management*, 4(1), 1-8.

Hildebrandt, U., Regvar, M. & Bothe, H. (2007). Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry*, 68(1), 139-146.

Hodge, A. & Storer, K. (2015). Arbuscular mycorrhiza and nitrogen: implications for individual plants through to ecosystems. *Plant and Soil*, 386(1-2), 1-19.

Ipsilantis, I., Karamesouti, M. & Gasparatos, D. (2018). Beneficial microorganisms for the management of soil phosphorus. In: *Sustainable Agriculture Reviews*; Lichtfouse, E., (ed.); Springer: Cham, Switzerland, 32.

Koske, R. E. & Gemma, J. N. (1989). A modified

procedure for staining roots to detect VA-mycorrhizas. *Mycological Research*, 92(4), 486-505.

Kothari, S. K., Marschner, H. & Römheld, V. (1991). Contribution of the VA mycorrhizal hyphae in acquisition of phosphorus and zinc by maize grown in a calcareous soil. *Plant and Soil*, 131(2), 177-185.

Lehmann, A. & Rillig, M. C. (2015). Arbuscular mycorrhizal contribution to copper, manganese and iron nutrient concentrations in crops - a meta-analysis. *Soil Biology and Biochemistry*, 81, 147-158.

Leoni, B., Loconsole, D., Cristiano, G. & De Lucia, B. (2019). Comparison between chemical fertilization and integrated nutrient management: yield, quality, N, and P contents in *Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitam. cultivars. *Agronomy*, 9, 202.

Lin, C., Wang, Y., Liu, M., Li, Q., Xiao, W. & Song, X. (2020). Effects of nitrogen deposition and phosphorus addition on arbuscular mycorrhizal fungi of Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*). *Scientific Reports*, 10, 12260.

Maçik, M., Gryta, A. & Fraç, M. (2020). Biofertilizers in agriculture: An overview on concepts, strategies and effects on soil microorganisms. *Advances in Agronomy*, 162, 31-87.

Mahanty, T., Bhattacharjee, S., Goswami, M., Bhattacharyya, P., Das, B., Ghosh, A. & Tribedi, P. (2016). Biofertilizers: A potential approach for sustainable agriculture development. *Environmental Science and Pollution*, 24(4), 3315-3335.

Mitter, E. K., Tosi, M., Obregon, D., Dunfield, K. E. & Germida, J. J. (2021). Rethinking crop nutrition in times of modern microbiology: Innovative biofertilizer technologies. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 19, 5-29.

Naik, K., Mishra, S., Srichandan, H., Singh, P. K. & Sarangi, P. K. (2019). Plant growth promoting microbes: Potential link to sustainable agriculture and environment. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 21, 101326.

O'Hallorans, J. M., Lindemann, W. C. & Steiner, R. (2004). Iron characterization in manure amended soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 35(15 & 16), 2345-2356.

Ongley, E.D., Xiaolan, Z. & Tao, Y. (2010). Current status of agricultural and rural non-point source pollution assessment in China. *Environmental Pollution*, 158(5), 1159-1168.

Owen, D., Williams, A. P., Griffith, G. W. & Withers, P. J. A. (2015). Use of commercial bio-inoculants to increase agricultural production through improved phosphorus acquisition. *Applied Soil Ecology*, 86, 41-54.

Petkova, G., Nedyalkova, K., Perfanova, J. & Petrova, V. (2021). Response of alfalfa (*Medicago sativa* L.) to microbial inoculations with *Rhizobium meliloti*, *Pseudomonas fluorescens* and *Glomus intraradices*. *Bulgarian Journal of Soil Science, Agrochemistry and Ecology*, 55(2), 21-27.

Philippot, L., Spor, A., Hénault, C., Bru, D., Bizouard, F., Jones, C. M., Sarr, A. & Maron, P. A. (2013). Loss in microbial diversity affects nitrogen cycling in soil. *ISME*

Journal, 7(8), 1609-19.

Pii, Y., Mimmo, T., Tomasi, N., Terzano, R., Cesco, S. & Crecchio, C. (2015). Microbial interactions in the rhizosphere: Beneficial influences of plant growth-promoting rhizobacteria on nutrient acquisition process. A review. *Biology and Fertility of Soils*, 51(4), 403–415.

Pirttilä, A. M., Tabas, H. M., Baruah, N. & Koskimäki, J. J. (2021). Biofertilizers and biocontrol agents for agriculture: How to identify and develop new potent microbial strains and traits. *Microorganisms*, 9(4), 817.

Riaz, U., Shahzad, L., Anum, W. & Waheed, A. (2021). Favorable soil microbes for sustainable agriculture, *Handbook of Research on Microbial Remediation and Microbial Biotechnology for Sustainable Soil*, 135-157.

Ruggiero, C., Angelino, G., Ascione, S. & Napolitano, A. (2004). Effect of water regime and nitrogen fertilisation on growth dynamics, water status and yield of Burley Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Beiträge zur Tabakforschung/Contributions to Tobacco Research*, 21(4), 223-233.

Smith, S. E. & Smith, F. A. (2011). Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: New paradigms from cellular to eco-system scales. *Annual Review of Plant Biology*, 62, 227–250.

Stancheva, I., Geneva, M., Djonova, E., Kaloyanova, N., Sichanova, M., Boychinova, M. & Geogiev, G. (2008). Response of alfalfa (*Medicago sativa* L.) growth at low accessible phosphorous source to the dual inoculation with mycorrhizal fungi and nitrogen fixing bacteria. *General and Applied Plant Physiology*, 34(3-4), 319–326.

Strickland, M. S., Lauber, C., Fierer, N. & Bradford, M. A. (2009). Testing the functional significance of microbial community composition. *Ecology*, 90(2), 441–51.

Subhashini, D. V. (2016). Effect of NPK fertilizers and co-inoculation with phosphate-solubilizing arbuscular mycorrhizal fungus and potassium-mobilizing bacteria on growth, yield, nutrient acquisition, and quality of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 47(3), 328-337.

Verma, M., Mishra, J. & Arora, N. K. (2018). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Diversity and Applications. In book: *Environmental Biotechnology: For Sustainable Future*, 129-173.

Wagg, C., Bender, S. F., Widmer, F. & van der Heijden, M. G. A. (2014). Soil biodiversity and soil community composition determine ecosystem multifunctionality. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(14), 5266-5270.

Wu, S. C., Cao, Z. H., Li, Z. G., Cheung, K. C. & Wong, M. H. (2005). Effects of biofertilizer containing N-fixers, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. *Geoderma*, 125(1-2), 155-166.

Zhang, S., Lehmann, A., Zheng, W., You, Z. & Rillig, M. C. (2019). Arbuscular mycorrhizal fungi increase grain yields: a meta-analysis. *New Phytologist*, 222, 543–555.

Zou, C., Pearce, R. C., Grove, J. H. & Coyne, M. S. (2017). No-tillage culture and nitrogen fertilizer management for burley tobacco production. *Journal of Agricultural Science*, 155(4), 599–612.