



БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО ФИЗИОЛОГИЯ НА РАСТЕНИЯТА И ГЕНЕТИКА
СЕКЦИЯ „ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА АЛГОЛОГИЯ“

ГЕРГАНА ВАЛЕРИЕВА ГЪЧЕВА

**Влияние на култивационни условия върху физиолого-
биохимични характеристики и биологични активности
на перспективни щамове микроводорасли**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертация
за присъждане на образователната и научна степен „доктор“

Научна специалност
01.06.16. – Физиология на растенията

Дисертацията е написана на 143 печатни страници и е онагледена с 32 фигури и 9 таблици. Списъкът на цитираната литература включва 459 източника, от които 8 на кирилица.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на от в заседателната зала на Институт по физиология на растенията и генетика – БАН, ул. Акад. Г. Бончев, бл. 21, ет. 2, на открито заседание на Научното жури, назначено със заповед на директора на ИФРГ – БАН № в състав:

Вътрешни членове:

1. Доц. д-р Лиляна Гигова
2. Доц. д-р Ирина Пунева

Външни членове:

1. Проф. д-р Майя Стойнева
2. Проф. дбн Димитър Пеев
3. Проф. дхн Божидар Чорбанов

Материалите по защитата са на разположение на интересуващите се в библиотеката на ИФРГ – БАН, ул. Акад. Г. Бончев, бл. 21, ет. 2, стая 225.



БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО ФИЗИОЛОГИЯ НА РАСТЕНИЯТА И ГЕНЕТИКА
СЕКЦИЯ „ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА АЛГОЛОГИЯ“

ГЕРГАНА ВАЛЕРИЕВА ГЪЧЕВА

**Влияние на култивационни условия върху физиолого-
биохимични характеристики и биологични активности
на перспективни щамове микроводорасли**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертация
за присъждане на образователната и научна степен „доктор“

Научна специалност
01.06.16. – Физиология на растенията

Научен ръководител: доц. д-р Лиляна Гилова

Рецензенти:

Доц. д-р Ирина Пунева

Проф. д-р Майя Стойнева

София, 2012

Благодарности

Благодаря на Бог за живота, който ми е дал, за колегите и работата ми в ИФРГ-БАН.

Благодаря специално на научния си ръководител доц. д-р Лиляна Гигова за всичко, на което ме научи през тези години, за ценните съвети и критичните забележки, за търпението и огромната помощ при изготвянето на дисертацията.

Благодаря на колегите от секция Експериментална алгология за подкрепата и насърчението при изработването на дисертацията.

Благодаря на ръководството на ИФРГ-БАН за осигурените условия за ползотворна изследователска дейност и оказаната помощ през годините.

Благодаря на колегите от ИЕМПАМ-БАН и ИМ Стефан Ангелов – БАН за извършените анализи за биологична активност и за любезно предоставените данни, които са включени в настоящия дисертационен труд.

Благодаря на Фонд „Научни изследвания“ при МОМН за осигуреното финансиране на проект: „Нови щамове микроводорасли – продуценти на продукти с потенциално икономическо и медицинско значение“ (Д002-99/2008), чрез което беше възможно изпълнението на описаните изследвания.

Благодаря на родителите си за това, че са ме родили и отгледали, за всеотдайната любов, дълготърпението и непрестанните грижи и подкрепа.

Благодаря на близките и приятелите си, че са до мен.

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

АКФ	– активни кислородни форми
АОЕ	– антиоксидантни ензими
АСВ	– абсолютно сухо вещество
ВСИ	– висока светлинна интензивност ($2 \times 132 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$)
ЕПЗХ	– екзополизахариди
ИК ₅₀	– концентрация, потискаща растежа на 50% от туморните клетки
КПЗХ	– каспсуларни полизахариди
МИК	– минимална инхибираща концентрация
МК	– мастни киселини
НСИ	– ниска светлинна интензивност ($132 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$)
Ст. ф.	– стационарна фаза
ФБП	– фикобилипротеини
САТ	– каталаза
EDTA	– етилендиаминтетраоцетна киселина
GLA	– γ -линоленова мастна киселина
GR	– глутатион редуктаза
HeLa	– човешка ракова клетъчна линия от карцином на цервикса
IOD	– интегрирана оптична плътност
OD	– оптична плътност
PAGE	– електрофореза в полиакриламиден гел
POD	– пероксидаза
SDS-PAGE	– електрофореза в полиакриламиден гел в присъствие на натриев додецилсулфат
SOD	– супероксид дисмутаза

У В О Д

Микроводораслите са повсеместно разпространени – във водите и на сушата – от Северния Ледовит океан до тропиците и от тропиците до Антарктида, от морските дълбочини до най-високите върхове. В природните местообитания те често са подложени на действието на стресови фактори с абиогенен (ниски или високи температури, засушаване, висока/ниска светлинна интензивност, недостиг на хранителни вещества и др.) и/или с биогенен произход (взаимодействие с други организми – конкуренция, паразитизъм). В основата на оцеляването на микроводораслите при сурови условия, или в среда с променящи се в широки граници физико-химични параметри и/или в силно конкурентна среда, е изключителната им физиолого-биохимична пластичност. Тези микроорганизми са развили различни механизми за приспособяване – промяна в съотношението и състава на основните структурни и функционални компоненти на клетката (белтъци, въглехидрати, липиди, пигменти), активиране на неензимни и ензимни системи за защита, синтеза на вещества с цитотоксично, антибиотично, алелохимично действие, сред които разнообразни вторични метаболити (изопреноиди, токсини) и др.

Поради изключителния им биосинтетичен потенциал, както и поради възможността за контролирано отглеждане, микроводораслите все повече се използват за производство на биомаса и полезни продукти с приложения в хранителната, козметичната, фармацевтичната и текстилната промишленост, както и в селското стопанство. През последните десетилетия вниманието е насочено и към биомедицинското им приложение. *In vitro* изследванията показват, че микроводораслови метаболити проявяват антибактериална, антигъбна, антивирусна, антитуморна, антиплазмодиялна, алгицидна, имуностимулираща и други видове активности. В световен мащаб голям брой щамове са изследвани за биологична активност и са изолирани редица активни вещества. Огромното видово богатство и разнообразието на екологичните ниши, в които се срещат микроводораслите, предполагат големи възможности за намиране, изолиране и характеризиране на нови щамове, както и на по-активни или с по-широк спектър на биологична активност вещества.

В тази връзка, настоящата работа бе насочена към разкриване на потенциала на нови и непроучени щамове микроводорасли да произвеждат вещества с антибактериално, антигъбно и цитотоксично действие и към оценка на биотехнологичната перспективност на най-добрите продуценти. Изследвани бяха възможностите на подбрани щамове-продуценти за растеж и за синтез на биологично активни вещества при различни условия на култивиране (температура, светлинна интензивност), както и способността им да преодоляват неблагоприятни фактори на средата.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия дисертационен труд е да се установи влиянието на температурата, светлинната интензивност и възрастта на културата върху физиолого-биохимични характеристики и биологични активности на нови щамове микроводорасли, перспективни продуценти на вещества, потискащи растежа на човешки патогени и туморни клетки.

За постигане на тази цел си поставихме следните **задачи**:

1) Да се изследват и сравнят възможностите на различни видове/щамове микроводорасли да синтезират биологично активни вещества. Задачата включва:

- изследване на антибактериална, антигъбна и цитотоксична активност на микроводораслови метаболити;

Очакван резултат от изпълнението на тази задача бе да се определят най-перспективните продуценти на биологично активни вещества, обекти на последващите ни задачи:

2) Да се изследва влиянието на култивационната температура и светлинна интензивност върху:

- растежа и биохимичния състав и
- активността на ензими от антиоксидантната защитна система, протеази и естерази на перспективни щамове микроводорасли;

3) Да се изследва влиянието на температурата, светлинната интензивност и възрастта на културата върху биологичната активност на перспективни щамове микроводорасли:

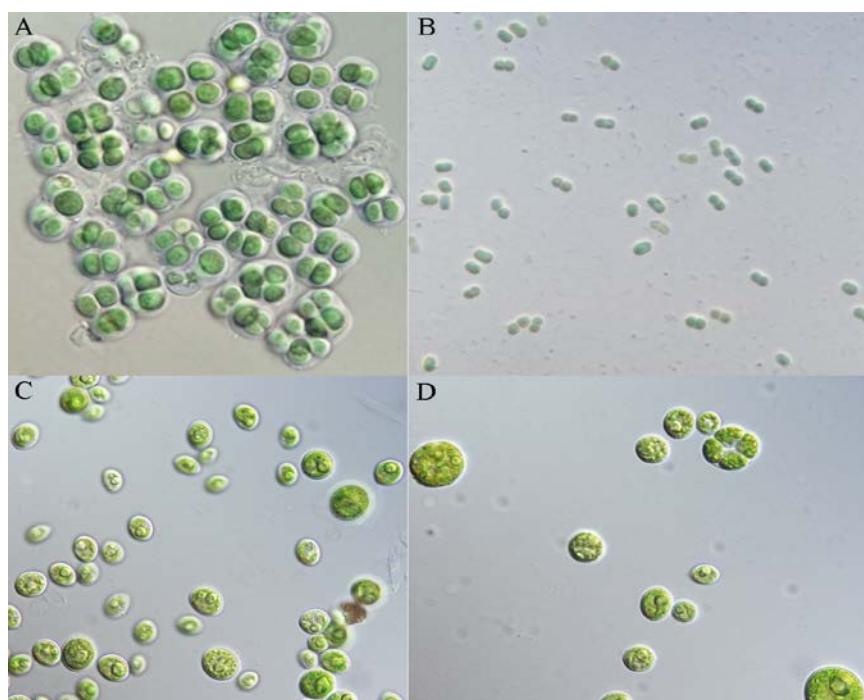
- изследване на промените в антибактериалната и антигъбна активност на техни вътреклетъчни и извънклетъчни метаболити;
- изследване на промените в цитотоксичността на микроводорасловите метаболити.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Щамове микроводорасли и условия на култивиране

Първоначалните ни изследвания за оценка и сравняване на биологична активност са проведени с 20 щама микроводорасли от четири отдела: 12 щама от отдел Cyanophyta, 2 от Rhodophyta, 1 от Ochrophyta и 5 от Chlorophyta (Таблица 1). Пет от тях са нови български изолати: цианопрокариотите *Gloeocapsa* sp. R-06/ и *Synechocystis* sp. R10, зелените водорасли *Chlorella* sp. R-06/2, *Coelastrella* sp. IOC и един неопределен щам, означен като 3B 1 (Фиг. 1).

Изолирането на новите щамове беше извършено по метода на щрихите върху агарова среда до получаването на единични колонии (Andersen & Kawachi, 2005).



Фиг. 1. **A** – *Gloeocapsa* sp. R-06/1; **B** – *Synechocystis* sp. R10; **C** – *Coelastrella* sp. IOC; **D** – 3B 1.

2. Подържане и лабораторно култивиране на микроводораслите

Подържането на опитните щамове и култивирането на водораслите бе осъществено на съоръжения, конструирани в Институт по физиология на растенията и генетика – секция Експериментална алгология:

1. Луминистат, използван за съхранение и подържане на опитните щамове върху скосен агар и в течни хранителни среди при екстензивни условия – температура 20°C и осветеност 80 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$.

2. Блок за интензивно култивиране на водораслите при предварително зададена температура, едностранно осветяване (132 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$) и продухване с въздух, обогатен с 2-3% въглероден диоксид. Култивирането се провеждаше в съдове с работен обем 200 ml.

3. Блок с температурен градиент, използван за интензивно култивиране на водораслите при условия на температурен градиент – от 15 до 44°C, осветеност 132 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ (НСИ) и 2×132 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ (ВСИ) и продухване с въздух, обогатен с 2-3% въглероден диоксид. Култивирането се провеждаше в специални съдове с работен обем 80 ml.

Таблица 1. Списък на щамовете, изследвани за биологична активност.

№	Отдел/разред	Вид	Щам	Находище	Хранителна среда
	Cyanophyta				
1.	Chroococcales	<i>Gloeocapsa</i> sp. Kützing	R-06/1	термален извор, Рупите, България ^a	Aiba & Ogawa (1977)
2.	Chroococcales	<i>Synechocystis</i> sp. Sauvageau	R10	термален извор, Рупите, България ^a	Aiba & Ogawa (1977)
3.	Nostocales	<i>Anabaena</i> sp. Bory de Saint-Vincent ex Bornet & Flahault	Takacova 1984/1	локва, Институт по Ботаника, гр. Требон, Чехия ^b	BG-11 (Rippka et al., 1979)
4.	Nostocales	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i> (Linnaeus) Ralfs	-	цъфтеж, езеро, Чехия	Природна проба
5.	Nostocales	<i>Mastigocladus laminosus</i> Cohn	Lukavský 2008/21b	проба, взета от Линда Небдалова ^b	D (Castenholz, 1969)
6.	Nostocales	<i>Nostoc cf. calcicola</i> C.Agardh	Desortova 1967/2	Долина Велка Котелни яма, Чехия ^b	Z8 (Kótai, 1972)
7.	Nostocales	<i>Nostoc entophytum</i> Bornet & Flahault	Zehnder/76	Камерун ^b	BG-11 (Rippka et al., 1979)
8.	Nostocales	<i>Nostoc muscorum</i> C. Agardh ex Bornet & Flahault	Lukešová 1986/14	почвена проба, Chelčice поляна, Чехия ^b	Z8 (Kótai, 1972)
9.	Nostocales	<i>Nostoc sphaericum</i> Vaucher ex Bornet & Flahault	-	Требон, Чехия	Природна проба
10.	Nostocales	<i>Nostoc</i> sp. Vaucher ex Bornet & Flahault	-	почвена проба, Мелник, България	Природна проба
11.	Nostocales	<i>Scytonema ocellatum</i> Bornet & Flahault	Adhikary 231minus	неизвестно ^b	Z8 (Kótai, 1972)
12.	Pseudanabaenales	<i>Arthronema africanum</i> (G.H.Schwabe) J.Komárek & J.Lukavský	Lukavský 1980/1	локва с висока соленост, морски бряг, Кувейт ^b	Z8 (Kótai, 1972)
	Ochrophyta				
13.	Mischococcales	<i>Trachydiscus minutus</i> (P.Bourrelly) H.Ettl	Lukavsky & Pribyl 2005/1	техническо съоръжение, ядрена централа Темелин, Чехия ^b	3-fold Z (Staub, 1961)
	Chlorophyta				
14.	Sphaeropleales	<i>Scenedesmus obliquus</i> (Turpin) Kützing	Lhotsky O. 1966/7	Требон, Чехия ^b	Z (Staub, 1961)
15.	Sphaeropleales	<i>Scenedesmus incrassatulus</i> Bohlin	R-83	термален извор, Рупите, България	Setlik (1967)
16.	Chlorellales	<i>Chlorella</i> sp. Beijerinck	R-06/2	термален извор, Рупите, България ^a	Setlik (1967)
17.	неопределен	Зелено водорасло (ЗВ 1) ^c	-	почвена проба, Левище, България ^a	Setlik (1967)
18.	Sphaeropleales	<i>Coelastrella</i> sp. Chodat	IOC	стена, София, България ^a	Setlik (1967)
	Rhodophyta				
19.	Rhodellales	<i>Rhodella violacea</i> (Kornmann) Wehrmeyer	Hindak	неизвестно ^b	Pekarkova et al., 1988
20.	Rhodellales	<i>Rhodella reticulata</i> Deason, G.L.Butler & C.Rhyne	UTEXZB2320	прибрежни езера, Тексас, САЩ ^d	Pekarkova et al., 1988

^a, нови български изолати; ^b, предоставени от колекцията на Института по Ботаника, ЧАН (ASCR, Třeboň); ^c, условно означено като ЗВ 1 (зелено водорасло); ^d - предоставено от колекцията на Факултета по Ботаника на Университета в Austin, Texas, USA.

3. Аналитични методи

Количеството на сухото водораслово вещество (АСВ) бе определяно тегловно след отстраняване на солите и сушене на биомасата при 105°C до постоянно тегло.

Степента на растеж [μ] беше изчислявана по формулата:

$$\mu = \frac{\ln(m_{t2}/m_{t1})}{t_2 - t_1}$$
 (Levasseur et al., 1993), където m_{t1} е сухото тегло в началото на култивационния период (t_1) - (0 ден) и m_{t2} е сухото тегло в края на култивационния период (t_2) - (4 ден).

Съдържанието на хлорофил *a* и каротеноиди във водорасловата биомаса бе определяно спектрофотометрично след екстракция с кипящ метанол и изчислено по формулите на Maskinney (1941).

Съдържанието на фикобилипротеини беше определяно след механично дезинтегриране на водорасловата биомаса на VIBRATIONSHOMOGENISATOR VHГ1, DDR (за 40-50 мин.), с последващо отделяне на супернатанта и разреждане с 0.01 М фосфатен буфер (рН 6.8), спектрофотометрично измерване при дължини на вълната 620 nm (С-фикоцианин) и 652 nm (алофикоцианин) и изчисляване по уравненията на Siegelman & Kysia (1978).

Съдържанието на общи белтъци бе определяно по метода на Lowry (1951).

Въглеродното съдържание беше определяно по фенол-серния метод на Dubois et al. (1956).

Съдържанието на общи липиди, количеството и състава на мастните киселини бяха определени по метод, описан от Петков (1990).

4. Приготвяне на микроводораслови проби за изследване на биологична активност

След култивиране, водорасловите суспензии бяха центрофугирани (5000 g, 20 мин.). Проби за изследване на биологична активност бяха приготвени както от водорасловата биомаса, така и от свободната от клетки културална течност.

4.1. Водни клетъчни екстракти и проби от културална течност

Воден екстракт от дезинтегрирани водораслови клетки беше приготвен чрез инкубиране на пробите във водна баня (90°C) за 2.5 часа и последващо центрофугиране за 20 мин. при 10000 g. Горещите екстракти, както и определен обем от културалната течност, бяха лиофилизирани. Сухите субстанции бяха суспендирани в стерилна дестилирана вода в концентрация 25 mg/ml.

4.2. Изолиране на извънклетъчни полизахариди (ЕПЗХ)

Полизахаридите, отделени в културалната среда, бяха утаени с 96% етанол в съотношение 1:3. Утайката беше промита трикратно с 65% етанол за отстраняване на онечистванията, изсушена и разтворена в стерилна дестилирана вода.

4.3. Извличане на общи липофилни вещества от биомасата – етанолен екстракт

Мастноразтворимите вещества бяха извличани от биомасата с 96% етанол. Извлекът бе изпаряван до сухо на ротационен вакуум изпарител при 60°C и суспендиран в метанол в концентрация 50 mg/ml.

4.4. Изолиране на мастни киселини

За разделяне на мастните киселини от липидите бе извършвана алкална хидролиза с 5% KOH, разтворена в 96% етанол. Получените при хидролизата калиеви соли на мастните киселини се превръщаха в свободни мастни киселини, които се извличаха с хексан. Хексанът бе изпаряван и заместен с метанол (20 mg/ml). За превръщането на мастните киселини във водоразтворими натриеви соли, към пробата беше добавян наситен разтвор на NaHCO₃.

5. Изследване на биологична активност

5.1. Антибактериална и антигъбна активност

5.1.1. Определяне на минималната инхибираща концентрация

Минималната инхибираща концентрация (МИК) беше определена по метода на микроразрежданията в течна среда, описан от Andrews (2001). МИК е най-ниската концентрация от тестваната проба, която потиска видимия микробен растеж след 24 часа инкубиране при 37°C (за бактериите) и 30°C (за гъбата).

5.2. Цитотоксичност *in vitro* (MTT тест)

Използвана бе перманентна човешка ракова клетъчна линия (HeLa) от карцином на цервикса. Ефектът на различните проби водорасли върху жизнеността на HeLa туморни клетки беше оценен чрез колориметричен MTT анализ (Mossmann, 1983). Клетъчната жизненост се изчисляваше както следва:

$$\text{Клетъчна жизненост (\%)} = \text{OD}_{540} (\text{опит}) / \text{OD}_{540} (\text{контрол}) \times 100.$$

За контрола (отрицателна) служеха нетретираните HeLa клетки. Доксорубицинът (положителна контрола) в използваната стандартна концентрация (10 µg/ml) потискаше растежа на HeLa клетките до около 50%.

6. Изолиране и анализиране на разтворимите клетъчни белтъци

Утаени чрез центрофугиране клетки бяха суспендирани в 60 mM TE (Tris base с 0.1 mM ЕДТА) буфер (pH 6.8) и механично дезинтегрирани. Клетъчният хомогенат беше центрофугиран за 15 мин. при 13 000g и разтворимите клетъчни белтъци в супернатанта бяха подлагани на последващ анализ. Концентрацията на белтъците беше определяна по Bradford (1976).

6.1. Едномерна електрофореза в полиакриламиден гел при неденатуриращи условия и анализ на изоформите и относителната ензимна активност след субстратна реакция в гела

Равни количества (20 µg) разтворими белтъци от клетки, култивирани при изследваните експериментални условия, бяха подложени на непрекъсната PAGE при неденатуриращи и нередуциращи условия, както е описано от Laemmli (1970), но в отсъствие на SDS. След електрофореза, геловите бяха оцветявани за супероксид дисмутаза (SOD, EC 1.15.1.1), каталазна (CAT, EC 1.11.1.6), пероксидазна (POD, EC 1.11.1.7) и глутатион редуктазна (GR, EC 1.6.4.2) активности.

6.1.1. Супероксид дисмутаза

Изоформите на SOD бяха онагледени, следвайки методиката на Azevedo et al. (1998).

6.1.2. Каталаза

Определянето на каталазна активност бе извършено съгласно методиката на J.G. Scandalios (personal communication).

6.1.3. Глутатион редуктаза

Активността на GR беше установена по метод, описан от Anderson et al. (1995).

6.1.4. Пероксидаза

Бензидин специфична пероксидазна активност (POD) беше установена според описаното от Rao et al. (1996).

Непосредствено след оцветяване, всеки гел беше фотографиран с помощта на UVItec гел-документираща система (Cambridge, UK) и анализиран с Gel-Pro32 Analyzer (Media Cybernetics Inc., Bethesda, MD USA) софтуер. Активността на всеки изоензим (ивица на гела) беше измерена като интегрирана оптична плътност (IOD), в произволни единици. Тъй като почти всеки ензим има по няколко изоформи, сумата от техните стойности за IOD беше приета за обща (относителна) ензимна активност.

7. Анализ на екзополизахариден комплекс посредством електрофореза в полиакриламиден гел при денатуриращи условия (SDS-PAGE)

За установяване на промените в профила на полизахаридите и полипептидите в екзополизахаридния комплекс беше проведена SDS-PAGE, както е описано в 6. 1. След приключване на електрофорезата въглехидратите бяха оцветени с 0.2% (w/v) алцианово синьо (Wall & Gyi, 1988). Идентичен гел беше оцветен с 0.1% (w/v) Coomassie Brilliant blue R-250, за да се визуализират полипептидните ивици.

8. Достоверност на получените резултати и статистическа обработка

Култивирането на водораслите бе осъществявано при стерилни условия (хранителни среди, култивационни съдове и пр.). Микроскопският контрол бе извършен с микроскоп NU 2 – Karl Zeiss – Jenna при увеличение до 780×. Ежедневно бе контролирано биологичното състояние на културите. Снимките на микроводораслите бяха направени на микроскоп Olympus BX51 с камера Olympus DP71.

Всички опити бяха извършени в три повторения. Резултатите са представени като средни стойности и стандартни отклонения ($\pm$ SD). Статистически значимата разлика между отделните третирания беше установена чрез еднофакторен дисперсионен анализ (ANOVA), последван от Bonferroni's тест чрез използването на GraphPAD PRISM софтуер, Версия 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Стойностите на $P < 0.05$ бяха приети за значими.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Първата задача бе изпълнена в рамките на проект към Фонд „Научни изследвания“ на тема: „Нови щамове микроводорасли – продуценти на продукти с потенциално икономическо и медицинско значение“, осъществен от мултидисциплинарен екип, с водещото участие на изследователи от секция Експериментална алгология. Бяха оценени и сравнени възможностите на 20 щам микроводорасли (Таблица 1) да синтезират вещества с антибактериално, антигъбно и цитотоксично действие. Най-висок потенциал като продуценти на биологично активни вещества показаха новите български изолати, цианопрокариотите *Gloeocapsa* sp. R-06/1 и *Synechocystis* sp. R10, поради което бяха избрани за обекти на последващите ни задачи.

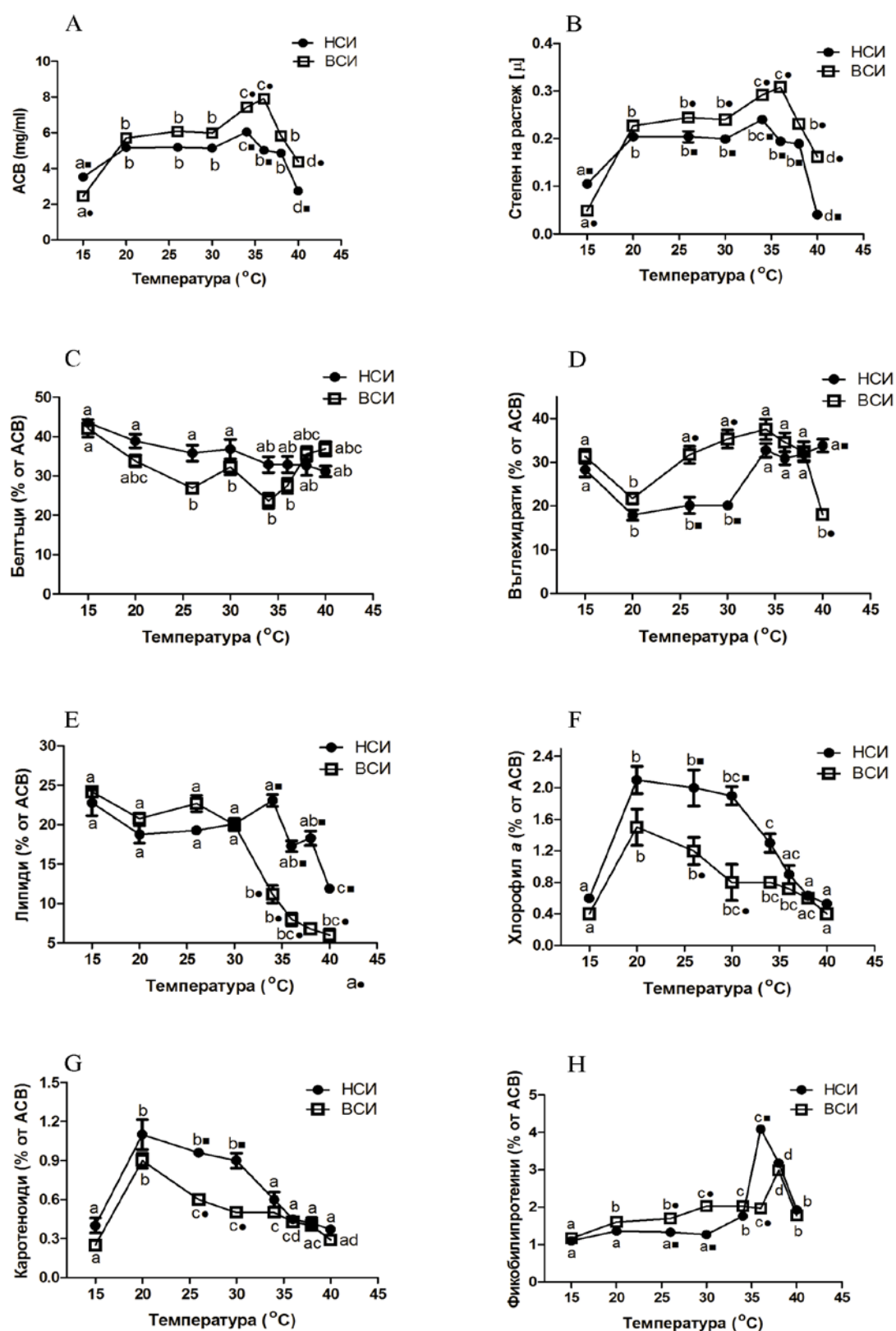
1. Физиолого-биохимична характеристика на *Gloeocapsa* sp. R-06/1 и *Synechocystis* sp. R10

1.1. Влияние на култивационната температура и светлинна интензивност върху растежа и биохимичния състав на *Gloeocapsa* sp.

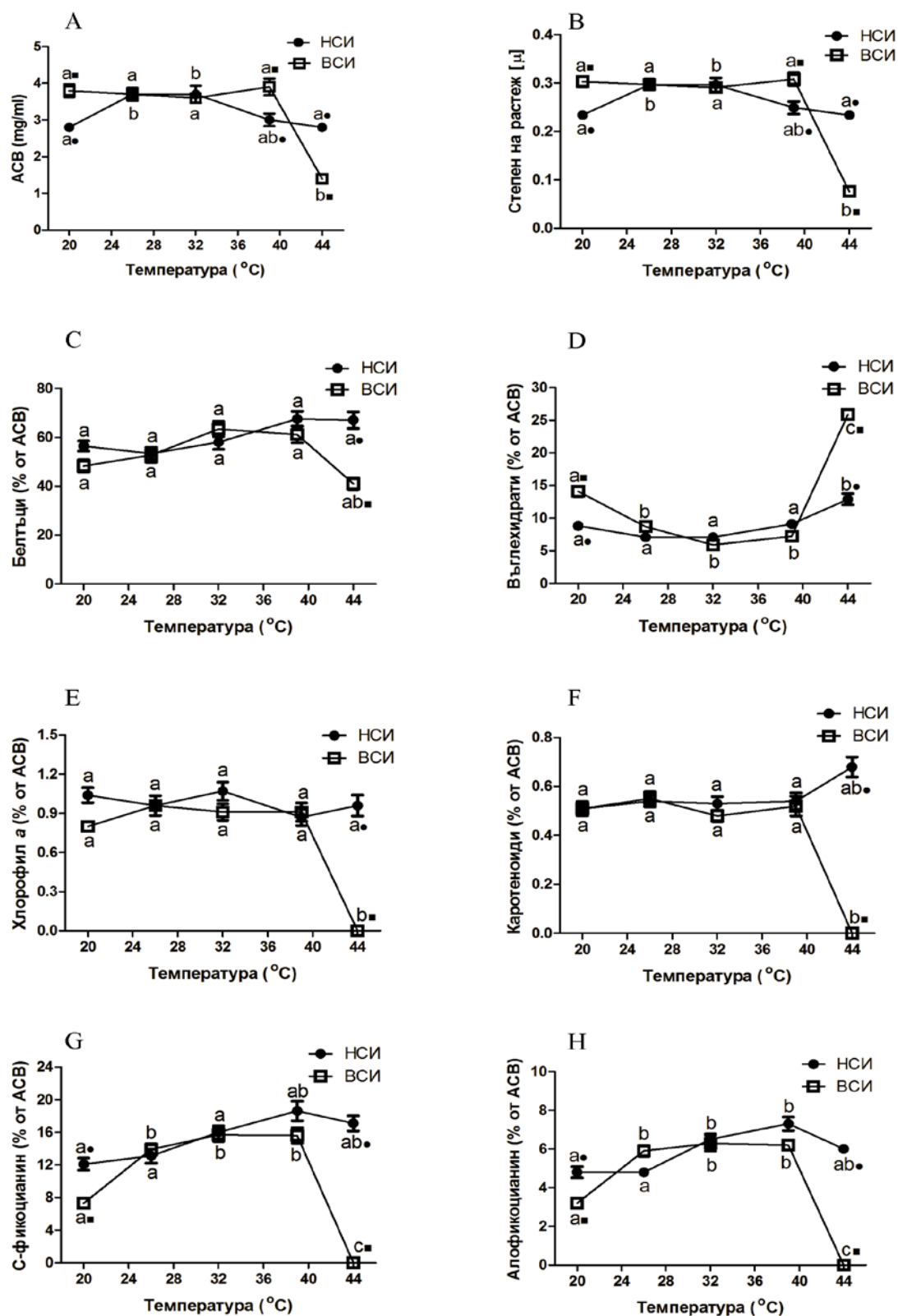
За изследване влиянието на температурата и светлинната интензивност и тяхното взаимодействие върху растежа и биохимичния състав на *Gloeocapsa* sp., водораслото е култивирано при осем различни температури (в областта 15–40°C) и две светлинни интензивности - 132 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ (условно обозначена като НСИ) и $2 \times 132 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ (условно обозначена като ВСИ). Оптимална температура за растеж е 34°C при НСИ и 36°C при ВСИ. След култивиране за 96 часа максимален растеж на *Gloeocapsa* sp. се отчита при 36°C, ВСИ, където сухото вещество достига 7.9 mg/ml (Фиг. 2А). Продуктивността и биохимичния състав на водораслото се променят в зависимост от температурата, като най-силно изразени са тези промени при 15 и 40°C. При тези температури растежът е значително потиснат. В сравнение с оптималната температура, при 15°C *Gloeocapsa* sp. натрупва белтъци и при двете светлинни интензивности (Фиг. 2С), като при високото осветяване се увеличават и общите липиди (Фиг. 2Е). При 40°C, двойно осветяване настъпва значително повишаване на белтъчното съдържание, наред с намаляване на въглехидратите. Ефектът на температурата върху съдържанието на хлорофил *a* и каротеноидите е сходен (Фиг. 2F и G). То е най-високо при 20-26°C и най-ниско при крайните температури. В сравнение с високото, ниското осветяване значително стимулира синтеза на хлорофил *a* и каротеноиди. Абсорбционният спектър на водоразтворим клетъчен извлек показва, че *Gloeocapsa* sp. синтезира два типа фикобилипротеини: С-фикоцианин и алофикоцианин. Субоптималните температури (30–15°C при НСИ и 26–15°C при ВСИ) водят до понижаване на съдържанието на ФБП, за разлика от супраоптималните (с изключение на 40°C), които стимулират синтеза на тези допълнителни пигменти (Фиг. 2H). При 36°C, НСИ съдържанието на ФБП достига най-висока стойност (4.09% от АСВ), която е два пъти по-висока от стойността при ВСИ.

2.2. Влияние на култивационната температура и светлинна интензивност върху растежа и биохимичния състав на *Synechocystis* sp.

Synechocystis sp. щам R10 е култивиран при 20, 26, 32, 39 и 44°C, при същите две светлинни интензивности (НСИ и ВСИ). Изборът на температурен обхват е съобразен с резултатите от предварителни изследвания с този щам. Оптимална температура за растеж при НСИ е 26-32°C, а при 20 и 44°C растежът е значително потиснат. При високото осветяване температурата в границите 20-39°C не повлиява значително растежа, докато комбинацията от 44°C и ВСИ е особено неблагоприятна. Количеството на биомасата на 96-тия час е най-голямо при 39°C, ВСИ. Интензивността на осветяване и температурата не оказват значителен ефект върху съдържанието на белтъци, въглехидрати, хлорофил и каротеноиди в клетките на *Synechocystis* sp., с изключение на крайно ниската и висока температури. При 44°C и ВСИ намалява съдържанието на белтъци; хлорофил и каротеноиди не се регистрират, докато общите въглехидрати се увеличават значително и достигат най-висок процент (26%). При 44°C и НСИ се стимулира значително продукцията на въглехидрати и каротеноиди. Много по-изразено е въздействието на изследваните физични фактори върху съдържанието на С-фикоцианин и алофикоцианин. С повишаване на температурата от 20 до 39°C се наблюдава постепенно увеличаване на количеството на двата пигмента, независимо от осветяването. При 44°C, НСИ съдържанието им слабо се понижава, докато при 44°C, ВСИ те не се регистрират. Като цяло, ниската светлинна интензивност стимулира синтеза на С-фикоцианин от 119 до 165% и на алофикоцианин от 118 до 150%. Най-голямо количество и на двата фикобилипротеина се наблюдава при култивиране на *Synechocystis* sp. R10 при 39°C и НСИ, където то достига 19% от АСВ за С-фикоцианин и 7.3% за алофикоцианин.



Фиг. 2. Промени в растежа (А и В) и съдържанието на белтъци (С), въглехидрати (D), липиди (Е) и пигменти (F - хлорофил *a*; G – каротеноиди; H – фикобилипротеини) в клетките на *Gloeocapsa* sp. R-06/1 като функция от култивационната температура и светлинна интензивност. Стойностите за определен параметър, отбелязани с различна буква, се различават значително ($P < 0.05$) за различните температури при съответното осветяване; различните символи (■, ●) показват значимите разлики за конкретна температура между НСИ и ВСИ.



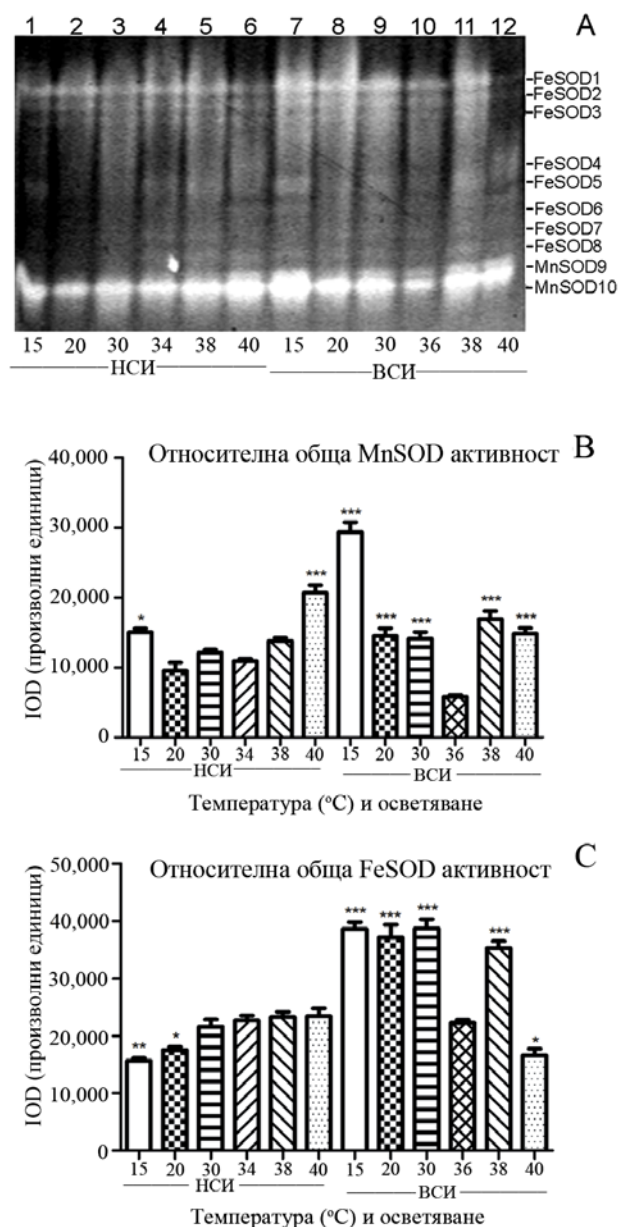
Фиг. 3. Промени в растежа (А и В) и съдържанието на белтъци (С), въглеhidрати (D) и пигменти (Е – хлорофил *a*; F – каротеноиди; G – С-фикоцианин; H – алофикоцианин) в клетките на *Synechocystis* sp. R10 като функция от култивационната температура и светлинна интензивност. Стойностите за определен параметър, отбелязани с различна буква, се различават значително ($P < 0.05$) за различните температури при съответното осветяване; различните символи (■, ●) показват значимите разлики за конкретна температура между НСИ и ВСИ.

За разлика от *Gloeocapsa* sp. R-06/1, която има ниско съдържание на фикобилипротеини (максимум от 4.09% от АСВ при 36°C, НСИ), при *Synechocystis* sp. наблюдаваме около 6 пъти по-високи нива на тези пигменти. Количеството на фикобилипротеините (26% от АСВ), синтезирани от *Synechocystis* sp. R10 при 39°C, НСИ, се доближава до това, докладвано за *Arthronema africanum* - 30% от АСВ при оптимални растежни условия (Chaneva et al., 2007), и е около 2-2,5 пъти по-голямо от установеното за *Spirulina* (Belay et al., 1993; Furnadzieva, 1999) и *Plectonema boryanum* (Chaneva et al., 1997).

Резултатите от тази група изследвания показват, че крайно ниските и високи температури потискат растежа на двата цианопрокариота (с изключение на 20°C, ВСИ при *Synechocystis* sp.). За да преодолее неблагоприятното въздействие, при 15°C *Gloeocapsa* sp. натрупва белтъци и при двете светлинни интензивности, като при високото осветяване се увеличават и общите липиди. Култивирането на *Gloeocapsa* sp. при 40°C, ВСИ води до значително повишаване на белтъчното съдържание, наред с намаляване на въглехидратите. Намаленото съдържание на липиди е отговор към най-високата изследвана температура при НСИ. За разлика от *Gloeocapsa* sp., при 44°C и ниско осветяване *Synechocystis* sp. натрупва въглехидрати, каротеноиди и фикоцианин. При високото осветяване значително се повишава съдържанието на въглехидрати при 20 и 44°C, като само при 44°C белтъчното съдържание намалява. Понижаване на общото белтъчно съдържание и нарастване на количеството на въглехидрати и липиди в клетките на цианопрокариота *Plectonema boryanum* при крайните култивационни температури (14.5 и 19°C; 43.4 и 44.5°C) и висока светлинна интензивност (2×8 000 lx) е описано от Чанева (1999).

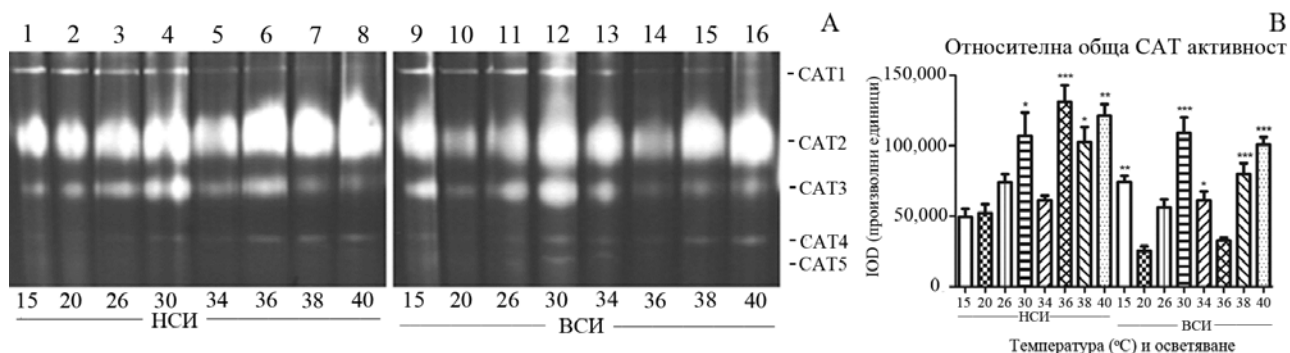
2.3. Влияние на култивационната температура и светлинна интензивност върху активността на антиоксидантни ензими на *Gloeocapsa* sp. R-06/1

В екстрактите от разтворими белтъци на *Gloeocapsa* sp. R-06/1, култивирана при различни температури и осветяване, се установяват девет конститутивни и една индуцируема изоформа на SOD (означени като SOD1-10) - (Фиг. 4). Супероксид дисмутази 1–8 са FeSOD металоформи, докато SOD9 и 10 представляват MnSOD. Както намаляването, така и повишаването на температурата на култивиране спрямо оптималната води до стимулиране на активността на MnSOD при ВСИ, докато при НСИ нарастването е значително само при 15 и 40°C (Фиг. 4В). Относителната обща FeSOD активност не се променя съществено в температурния обхват 30-40°C, НСИ, но при 20°C и особено при 15°C настъпва значително понижаване на активността (Фиг. 4С). При високата светлинна интензивност субоптималните температури стимулират FeSOD активността с около 44%, докато ефектът на температурите над оптималната е стимулиращ при 38°C (около 33%), но потискащ при 40°C (30% намаляване). Интересно е да се отбележи, че култивирането при 40°C значително променя електрофоретичния профил на FeSOD с поява на нова изоформа (SOD4) и понижаване на интензивността на SOD1, 2 и 3 изоформите, особено при ВСИ (Фиг. 4А).



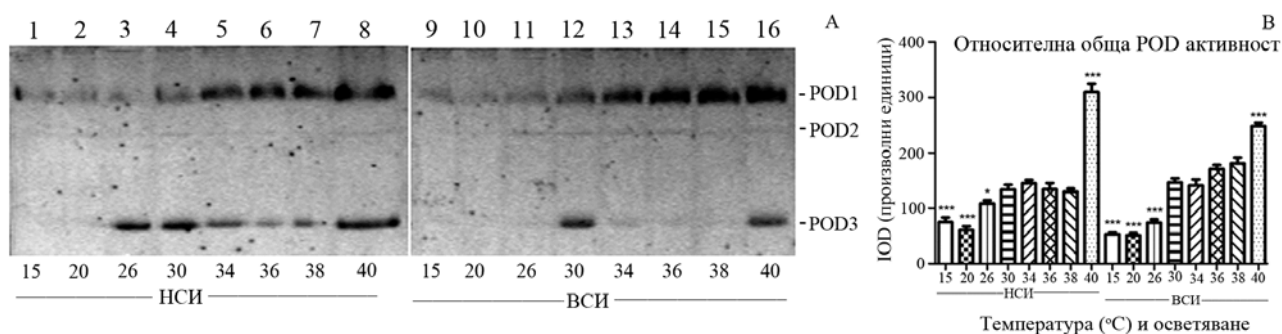
Фиг. 4. Изоензимен профил на **SOD** (A), обща активност на MnSOD (B) и обща активност на FeSOD (C) на *Gloeocapsa* sp. R-06/1, култивирана на шест температури при две светлинни интензивности. Във всяка ямка са нанесени по 20 µg белтък. В (B) и (C), баровете показват стандартното отклонение (n=3). Средните стойности, отбелязани със звездички, се различават значително (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001) от стойностите при оптималната растежна температура (34°C при HSI и 36°C при ВСИ).

След електрофоретично разделяне на разтворимите белтъци в полиакриламиден гел при нативни условия и последваща субстратна реакция, се установява наличието на четири изоформи на CAT (Фиг. 5A). Една допълнителна, слаба, бързо движеща се ивица (CAT5) се наблюдава както при 15 и 20°C, ниско осветяване, така и при пониските от оптималната температури при високо осветяване. При температури над оптималната общата CAT активност нараства значително, което се дължи главно на стимулиране на CAT2, докато ефектът на температурното понижаване е светлинно зависим (Фиг. 5B).



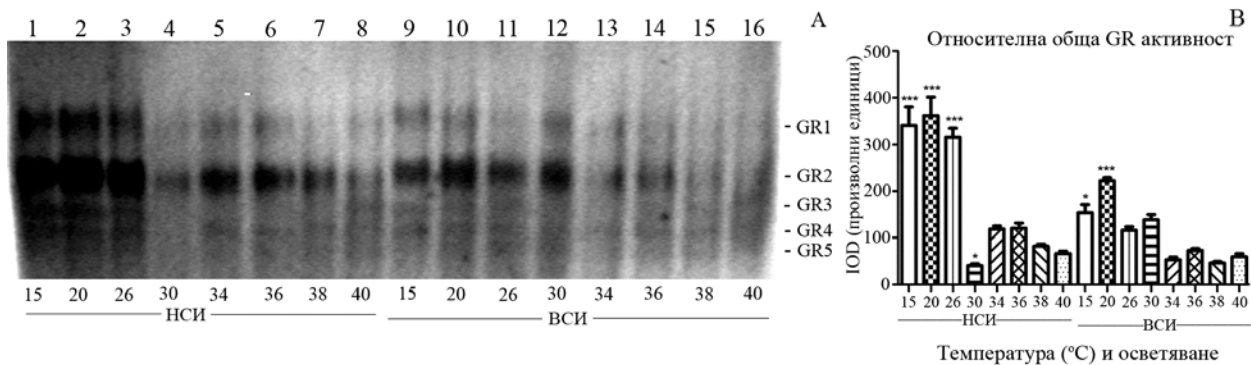
Фиг. 5. Активност на **CAT** след субстратна реакция в нативен полиакриламиден гел (**A**), показващ позицията и промяната на броя и интензивността на ензимните изоформи в *Gloeocapsa* sp. R-06/1 култивирана при посочените условия. Във всяка ямка са нанесени по 20 µg белтък. **B**, относителна обща **CAT** активност.

След багрене с бензидин като субстрат, нативната електрофореза показва три конститутивни **POD** изоензима, обозначени с **POD1** до 3 (Фиг. 6A). **POD2** е с много ниска и почти непроменяща се активност при различните условия на култивиране. Интензитетът на **POD1** и **POD3** обаче, значително се различава между отделните температури. В резултат, общата **POD** активност на клетките е сравнително висока при оптималната и близките до оптималната температури, силно намалява (около 2 до 3 пъти) при по-ниските температури (26-15°C) и е най-висока при 40°C, при двете приложени светлинни интензивности (Фиг. 6B).



Фиг. 6. A, Разделяне на изоформите на **POD** чрез нативна PAGE. Изоформите са онагледени посредством багрене в бензидин/ H_2O_2 и са номерирани по реда на нарастващата им електрофоретична подвижност. **B**, обща **POD** активност.

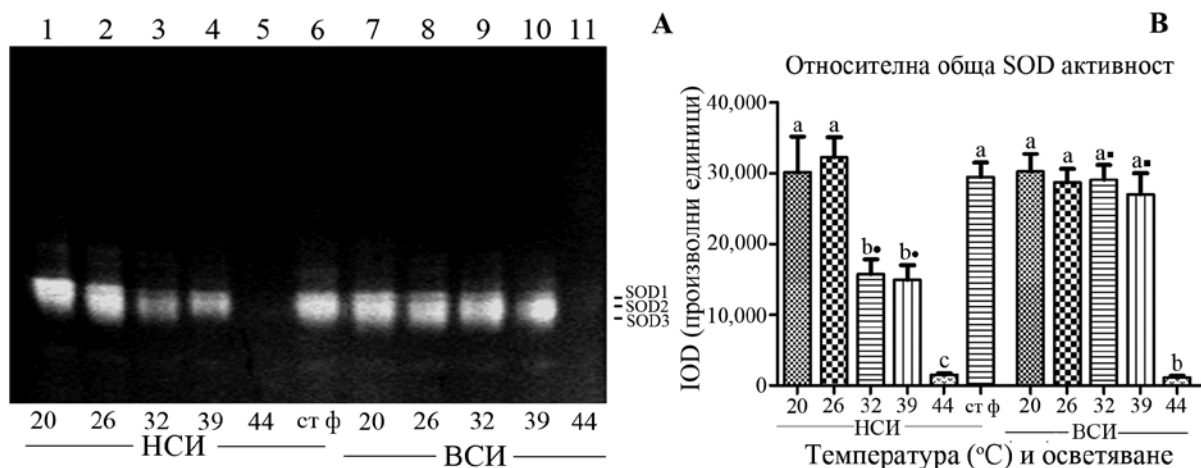
При всички култивационни условия се наблюдават четири ивици на глутатион редуктазна активност (**GR1**, 2, 4 и 5) - (Фиг. 7A). Култивирането при 15, 20, 26 и 40°C води до появата на **GR3**. В температурния диапазон 34-40°C, **НСИ** и 26-40°C, **ВСИ** относителната обща **GR** активност не се променя съществено (Фиг. 7B). При 15-26°C, ниско осветяване и 15-20°C, високо осветяване обаче се наблюдава значително повишаване на ензимната активност, дължащо се на активиране на **GR1** и особено на **GR2**.



Фиг. 7. Изоензимен профил (А), и обща активност (В) на **GR** в *Gloeocapsa* sp. култивирана при посочените условия. Във всяка ямка са нанесени по 20 µg белтък.

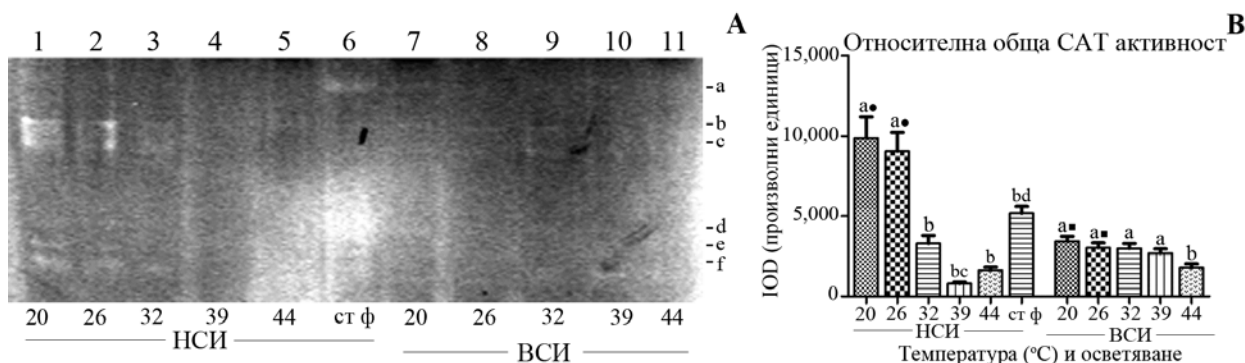
2.4. Ефект на култивационните условия върху активността на антиоксидантните ензими на *Synechocystis* sp. R10

В клетъчните екстракти от *Synechocystis* sp. R10, култивиран при различни температури и осветяване, се наблюдават три изоформи на SOD (означени като SOD1-3 по реда на нарастващата им подвижност в гела) - (Фиг. 8А). И трите представляват FeSOD металоформи, както установихме по тяхната чувствителност към H_2O_2 и резистентност към KCN. В пробите, получени след култивиране при НСИ, относителната обща SOD активност е най-висока при 20 и 26°C (Фиг. 8В), умерена при 32 и 39°C и много ниска при 44°C. За разлика от това, в пробите, получени след култивиране при ВСИ, общата ензимна активност не се променя значително в температурната област 20–39°C и само най-високата температура (44°C) има силно понижаващ ефект.



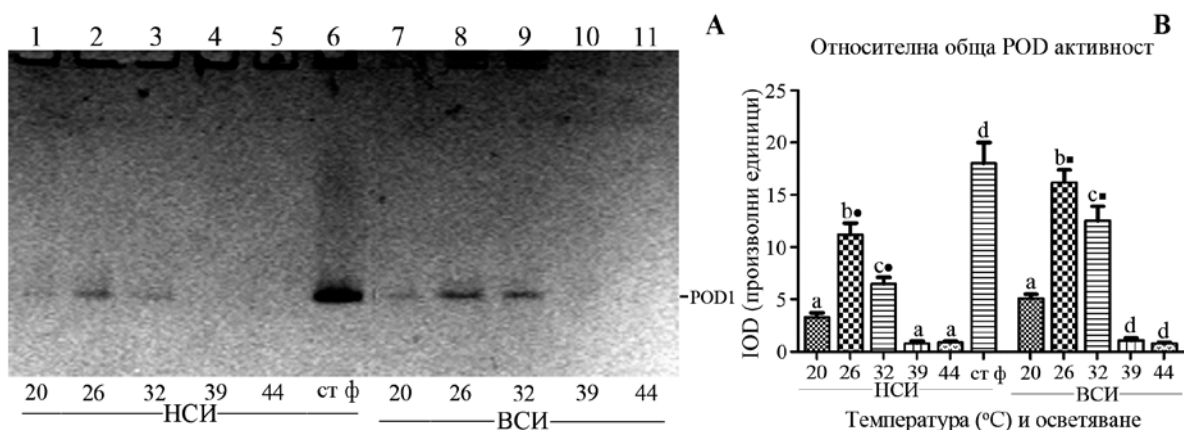
Фиг. 8. Изоензимен профил на SOD (А) и обща относителна **FeSOD** активност (В) на *Synechocystis* sp. R10, култивиран при пет различни температури и две светлинни интензивности. В ямките на гела са нанесени равни количества белтъци (20 µg). Изоформите на SOD са номерирани последователно от анода към катода.

По 6 ивици с каталазна активност се регистрират във всички проби (Фиг. 9А, а-ф). Относителната обща САТ активност е най-висока при 20°C, НСИ и постепенно намалява при по-високите култивационни температури при НСИ (Фиг. 9В). При ВСИ, температурите в областта от 20 до 39°C поддържат почти еднакви, ниски нива на САТ активност, която допълнително намалява при 44°C.



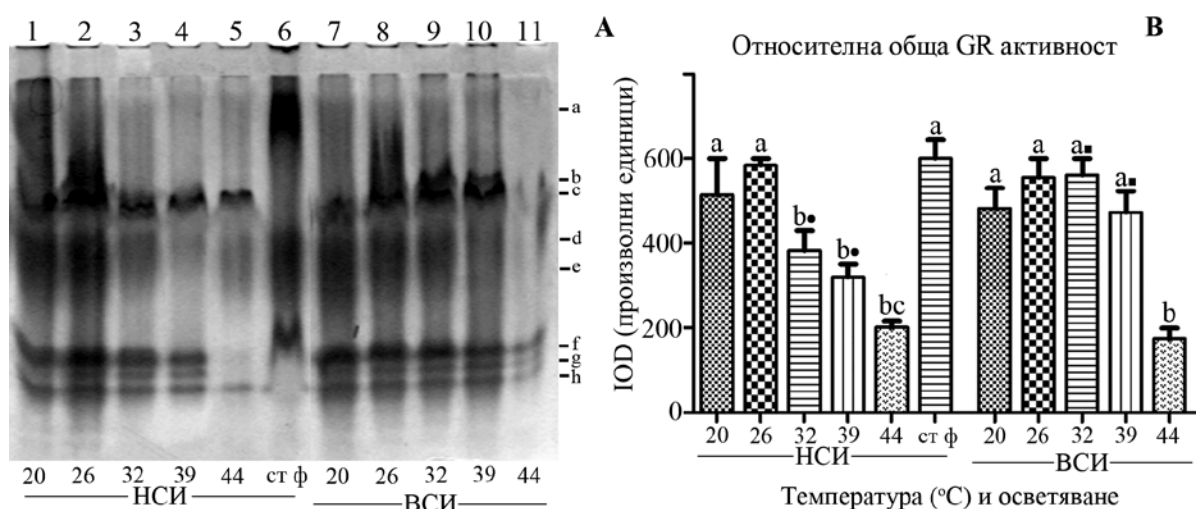
Фиг. 9. Активност на **CAT** след субстратна реакция в нативен полиакриламиден гел (**A**), показващ позицията и промяната на интензивността на ензимните изоформи в *Synechocystis* sp. R10, култивиран при пет различни температури и две светлинни интензивности. В ямките на гела са нанесени равни количества белтъци (20 µg). **B**, Промяна на относителната обща **CAT** активност при различните култивационни условия.

След багрене с бензидин като субстрат нативната електрофореза показва една ивица на активност (Фиг. 10A), добре забележима в пробите, получени след култивиране при 20, 26 и 32°C и двете светлинни интензивности. При по-високите температури ивицата почти не се забелязва. Ивицата на **POD** е най-интензивна при 26°C и с най-ниска интензивност при 15°C. Относителната обща **POD** активност е около 1.5–2-пъти по-висока в клетките, отглеждани при **ВСИ**, в сравнение с тези отглеждани при **НСИ** (Фиг. 10B).



Фиг. 10. **A**, Онагледяване на **POD** активност в нативен акриламиден гел посредством багрене с бензидин/ H_2O_2 . Във всяка ямка са нанесени по 20 µg белтък. **B**, Промяна на относителната **POD** активност на *Synechocystis* sp. в зависимост от култивационните условия.

Осем отчетливи ивици на **GR** активност (**GRa-h**) се регистрират в *Synechocystis* sp. R10 при всички условия на култивиране (Фиг. 11A). Интензитетът на ивиците варира в зависимост от условията, отразявайки се в промени в общата ензимна активност. При **НСИ** клетките, култивирани на 32°C, показват сравнително умерено ниво на активност на **GR** (Фиг. 11B). Отглеждането при по-ниски температури води до повишаване на **GR** активност, докато при по-високите температури, особено 44°C, се наблюдава значителен спад. В клетките, култивирани при високо осветяване, относителната обща активност на **GR** не се променя значително в температурния диапазон 20-39°C, но при 44°C се наблюдава приблизително 3 пъти намаление на активността.



Фиг. 11. Изоензимен профил (А), и обща активност (В) на **GR** в *Synechocystis* sp. R10, култивиран при различни условия. Във всяка ямка са нанесени по 20 µg белтък. В (А) с букви a-h са означени ивиците с GR активност по реда на нарастващата им електрофоретична подвижност.

В сравнение с 4-дневното, 14-дневното отглеждане на *Synechocystis* sp. при 32°C, НСИ води до повишаване на активността на всички изследвани антиоксидантни ензими.

Резултатите от тази група изследвания показват, че двата щама отговарят на промяната на култивационните условия (интензивността на светлината и особено температурата) чрез специфична за всеки от тях промяна на изоензимния профил и/или активността на основните антиоксидантни ензими. Отговорите към крайно високата и ниска температури са най-ясно изразени.

При цианопрокариотите са описани четири металоформи на SOD - NiSOD, MnSOD, FeSOD и Cu/ZnSOD (Priya et al., 2007). Нашите резултати показват, че в *Gloeocapsa* sp. щам R-06/1 се експресират MnSOD и FeSOD, с преобладаваща активност на FeSOD. Активността на MnSOD се променя при различните температури, като тези промени са различни от наблюдаваните при FeSOD, но и двете металоформи на ензима участват в отговора към неблагоприятните условия. При 15°C, НСИ активността на FeSOD намалява, но на MnSOD нараства. Същият ефект се наблюдава при 40°C, ВСИ. Вероятно, при тези условия FeSOD и MnSOD се допълват взаимно, поддържайки ниски нива на супероксидните радикали в клетките на *Gloeocapsa* sp. FeSOD е по-активна при ВСИ в сравнение с НСИ, докато активността на MnSOD не зависи от светлинната интензивност. В *Synechocystis* sp. R10 се регистрира само FeSOD активност. Водораслото поддържа високо ниво на супероксид дисмутазна активност при всички приложени условия на отглеждане, с изключение на 44°C (Фиг. 8).

В допълнение на MnSOD, активностите на CAT, POD, GR и FeSOD са включени в защитата на *Gloeocapsa* sp. от потенциално окислително увреждане. При 40°C активността на CAT и POD е значително по-висока в сравнение с нивата им при оптималната за растеж температура. Крайно ниската температура стимулира активността на MnSOD и GR при двете нива на осветяване и на FeSOD и CAT при високата светлинна интензивност. С прилагане на метода “оцветяване за ензимна активност в гел”, бе възможно да се разкрие проявата на специфичен отговор на всяка

изоформа на определен ензим, вероятно свързан с нейната локализация. При 15°C се наблюдава активиране на MnSOD10, CAT1, GR1, GR2 и поява на нови изоформи - CAT5 и GR3 при двете нива на осветяване, както и активиране на FeSOD1, CAT2 и CAT3 само при ВСИ. С повишена активност в отговор на високата температура са MnSOD10, CAT2, POD1, POD3, а FeSOD4 и GR3 се регистрират само при 40°C.

При *Synechocystis* sp. ензимната антиоксидантна защита се включва активно само при 20°C, НСИ, където се наблюдава значително повишена активност на FeSOD, CAT и GR. Натрупаните каротеноиди и С-фикоцианин вероятно участват в преодоляване на високата температура при НСИ, но не и АОЕ, чиято активност намалява при тези условия. Каротеноидите осигуряват ефективно неутрализиране на специфични АФК и натрупването им е общ отговор на цианобактериалните клетки към стрес (Burton & Ingold, 1984; Kelman et al., 2009). Известни са и антиоксидантните свойства на С-фикоцианина (Romay et al., 1998, 2003; Benedetti et al., 2004; Ji et al., 2011). За разлика от ниското, при високото осветяване, температурата в границите на 20-39°C не повлиява растежа на *Synechocystis* sp., което е свързано с относително постоянни нива на активност на АОЕ, с изключение на повишената активност на POD при по-ниските от 39°C температури. Оцеляването на цианобактерията при 44°C, ВСИ, където се наблюдава обезцветяване на клетките и ниска активност на всички изследвани АОЕ, е интересна тема на бъдещи изследвания.

Двата цианопроکاریота показват висока пластичност и способност да включват различни, но ефективни механизми за преодоляване на неблагоприятните условия на средата. Наблюдаваните специфични промени в изоензимния профил и/или активността на антиоксидантните ензими, както и в съдържанието на липиди, въглехидрати, белтъци и пигменти, са част от процеса на приспособяване и предполагат важната роля на тези биомолекули в температурната и светлинна толерантност на *Gloeocapsa* sp. R-06/1 и *Synechocystis* sp. R10. Познанията за границите и механизмите на тази толерантност са полезни и приложими в бъдещи биотехнологични разработки.

3. Влияние на температурата, светлинната интензивност и фазата на растеж върху биологичната активност на *Gloeocapsa* sp. R-06/1 и *Synechocystis* sp. R10

3.1. Антибактериална и антигъбна активност на *Gloeocapsa* sp.

За биологична активност са изследвани етанолен клетъчен екстракт, смес от мастни киселини, културална течност и извънклетъчни полизахариди от *Gloeocapsa* sp., култивирана за 4 дни при различни температури и две светлинни интензивности (НСИ и ВСИ). Изследвана е и култура, расла при 30°C, НСИ за 17 дни (стационарна фаза на растеж).

Изследвани по метода на микроразрежданията в течна хранителна среда, културалните течности показват, макар и ниска, активност срещу осемте тестирани патогена (Табл. 2). По-податлив на въздействие е *Staphylococcus aureus*, следван от *Yersinia enterocolitica* и *Bacillus cereus*, а *Streptococcus pyogenes* е нечувствителен към част от пробите (главно получените след култивиране при ВСИ). Чувствителност към действието на водните клетъчни извлекци проявяват *Staphylococcus aureus* (МИК от

1.56 или 3.12 mg/ml), *Streptococcus pyogenes* (с МИК=12.5 mg/ml и само за пробите от 26°C, НСИ и от стационарна култура МИК=3.12 mg/ml) и особено *Candida albicans* (стойностите на МИК варират от 0.78 до 6.25 mg/ml). Пробата, изолирана от култура в стационарна фаза на растеж е активна и срещу *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa*. С най-висока активност от изследваните компоненти на *Gloeocapsa* sp. (Табл. 2) са извънклетъчните й полизахариди (с изключение на активността срещу *Candida albicans*, където някои от водните екстракти са по-активни). Те потискат растежа на всички тест-бактерии и гъбата със стойности на МИК в рамките от 0.125 до 1.0 mg/ml.

Таблица 2. Влияние на температурата, светлинната интензивност и култивационният период върху антимикробната активност на *Gloeocapsa* sp., изследвана по метода на микроразрежданията в течна хранителна среда

Проба/Тест патоген	S. aureus	S. pyogenes	B. cereus	E. coli	P. aeruginosa	Y. enterocolitica	S. typhimurium	C. albicans
Културална течност								
15°C НСИ	6.25*	0	12.5	12.5	12.5	6.25	12.5	12.5
20°C НСИ	6.25	12.5	12.5	12.5	12.5	6.25	12.5	12.5
26°C НСИ	6.25	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5
30°C НСИ	6.25	12.5	12.5	12.5	12.5	6.25	12.5	12.5
34°C НСИ	6.25	12.5	12.5	12.5	6.25	6.25	12.5	12.5
36°C НСИ	6.25	12.5	6.25	6.25	6.25	6.25	12.5	12.5
38°C НСИ	6.25	12.5	6.25	12.5	12.5	6.25	12.5	12.5
40°C НСИ	6.25	12.5	6.25	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5
стац. фаза	3.12	12.5	6.25	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5
15°C ВСИ	6.25	0	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5
20°C ВСИ	6.25	0	0	12.5	12.5	12.5	12.5	0
26°C ВСИ	6.25	0	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	0
30°C ВСИ	3.12	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5
34°C ВСИ	3.12	0	6.25	6.25	12.5	6.25	12.5	12.5
36°C ВСИ	6.25	0	6.25	12.5	12.5	6.25	12.5	6.25
38°C ВСИ	6.25	0	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5
40°C ВСИ	3.12	0	6.25	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5
Воден екстракт								
26°C НСИ	1.56	3.12	0	0	0	0	0	3.12
30°C НСИ	1.56	12.5	0	0	0	0	0	1.56
34°C НСИ	1.56	12.5	0	0	0	0	0	0.78
38°C НСИ	1.56	12.5	0	0	0	0	0	1.56
стац. фаза	1.56	3.12	3.12	6.25	3.12	0	0	6.25
20°C ВСИ	1.56	0	0	0	0	0	0	0.78
26°C ВСИ	1.56	0	0	0	0	0	0	0.78
30°C ВСИ	1.56	0	0	0	0	0	0	1.56
34°C ВСИ	3.12	0	0	0	0	0	0	0.78
36°C ВСИ	3.12	12.5	0	0	0	0	0	0.78
38°C ВСИ	3.12	12.5	0	0	0	0	0	0
Извънклетъчни полизахариди								
15°C НСИ	0.25	1.00	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	1.00
20°C НСИ	0.25	0	1.00	0.25	0.25	0.50	0	1.00
26°C НСИ	0.50	0	0	0	0.50	0	0	0

30°C НСИ	0.25	0	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	1.00
34°C НСИ	0.25	0	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0
36°C НСИ	0.25	0	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	1.00
38°C НСИ	0.25	1.00	1.00	0.50	0.50	0.50	0.50	1.00
40°C НСИ	0.25	1.00	1.00	0.50	0.50	0.50	0.50	0
стац. фаза	0.06	0.50	0.12	0.12	0.12	0.25	0.12	0.25
15°C ВСИ	0.12	0	0.25	0.50	0.25	0.25	0.25	1.00
20°C ВСИ	0.25	0	0.50	0.50	0.50	0.25	0.50	1.00
26°C ВСИ	0.12	0	0.50	1.00	0.25	0.25	0.25	1.00
30°C ВСИ	0.25	0	0.50	0	0.50	0.50	0.50	0
34°C ВСИ	0.25	0	1.00	0.50	0.50	0.50	0.50	0
36°C ВСИ	0.50	0	1.00	0	1.00	0.50	1.00	0
38°C ВСИ	0.50	0	1.00	1.00	1.00	0.50	1.00	0
40°C ВСИ	0.50	0	1.00	0.50	1.00	0.50	0	0

* - стойности на Минималната Инхибираща Концентрация (МИК) в mg/ml; 0 - няма инхибиращ ефект

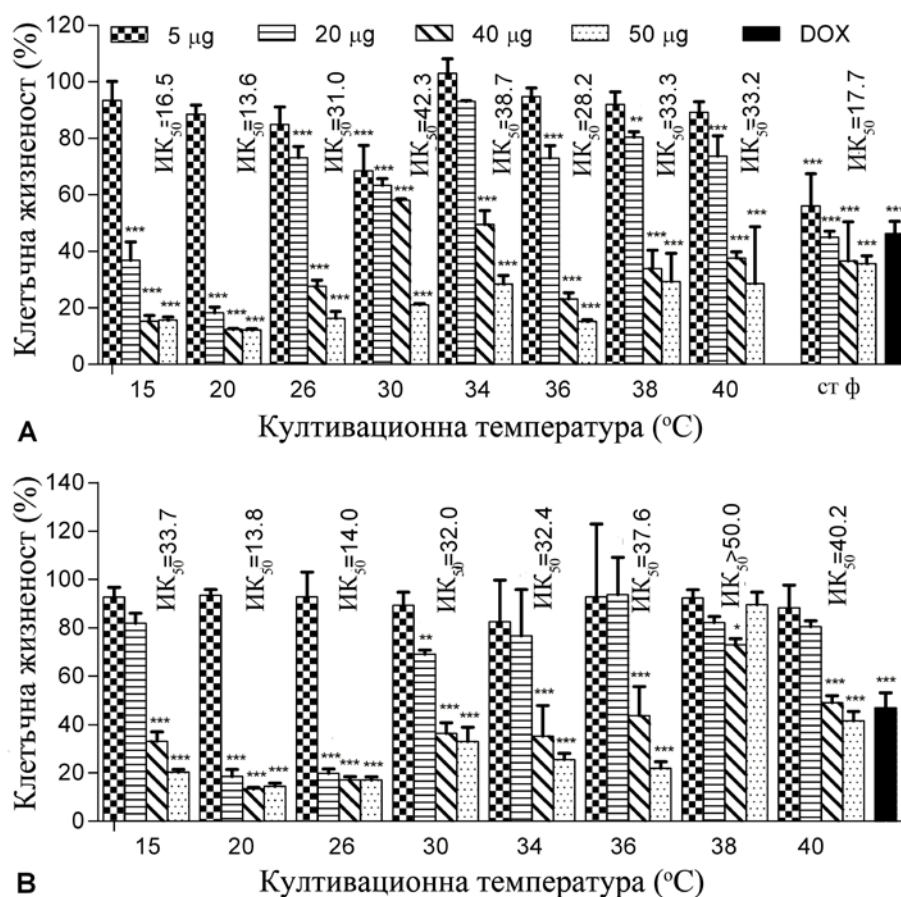
Влиянието на условията на култивиране върху антимикробната активност е най-забележимо при полизахаридите. Култивирането при ниски температури (15-20°C, НСИ и 15-26°C, ВСИ) стимулира активността. Само пробите, изолирани след култивиране при 15, 38 и 40°C, НСИ, потискат растежа на *Streptococcus pyogenes*. Като цяло, синтезираните при НСИ полизахариди са по-активни от тези при ВСИ. Отделените от култура в стационарна фаза ЕПЗХ са с най-ниски стойности на МИК за всички тест-бактерии и гъбата *Candida albicans*.

3.2. Цитотоксична активност на *Gloeocapsa* sp. R-06/1

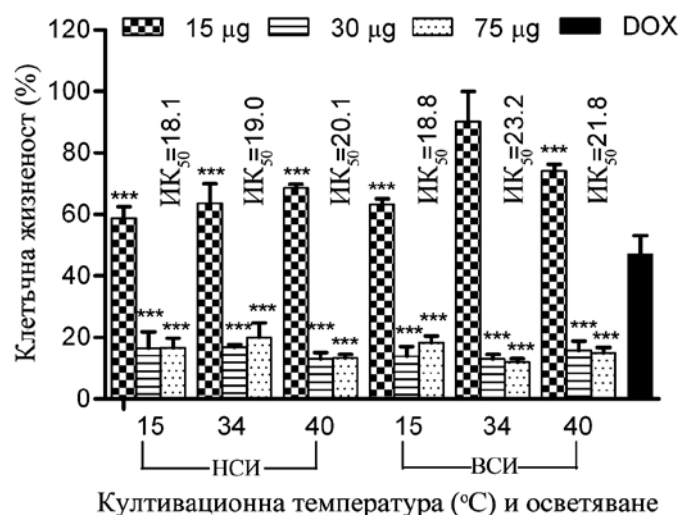
Цитотоксичната активност на *Gloeocapsa* sp., култивирана при различните температури и двете светлинни интензивности, е изследвана *in vitro* върху HeLa клетки. Влиянието на нарастващи концентрации (5-50 µg/ml) на извънклетъчните полизахариди върху жизнеността на раковите клетки е представено на Фиг.12. Всички проби намаляват растежа на HeLa клетките в зависимост от концентрацията, но в различна степен (ИК₅₀ е в границите от 13.6 до 42.3 µg/ml). Пробите, получени след култивиране при 30 и 34°C, ниско осветяване, имат най-слаба инхибираща способност. Понижаването на температурата води до постепенно нарастване на активността. Температурите над оптималната също стимулират цитотоксичността на екзоползахаридите, но в по-малка степен. Продължителното култивиране на *Gloeocapsa* sp. при 30°C има за резултат производството на по-активни полизахариди (Фиг. 12А - 30°C в сравнение със ст ф, ИК₅₀ намалява от 42.3 на 17.7 µg/ml). При висока светлинна интензивност ефектът на температурата върху активността на извънклетъчните полизахариди се различава от този при ниско осветяване. Оптималната (36°C) и супраоптималните температури поддържат сравнително ниски нива на цитотоксичност на ЕПЗХ (Фиг. 12В). Постепенно намаляване на жизнеността на HeLa клетките се наблюдава при въздействие с пробите, получени при субоптималните температури, с изключение на пробата от 15°C. Клетките на *Gloeocapsa* sp. култивирани при 20 и 26°C, ВСИ произвеждат екзоползахариди с най-

висока цитотоксичност, докато при ниското осветяване най-активни са пробите от 20 и 15°C.

Масните киселини от *Gloeocapsa* sp. R-06/1, расла при три различни температури (15, 34 и 38°C) и двете светлинни интензивности, потискат растежа на HeLa клетките дори при концентрация 15 µg/ml (Фиг. 13). С повишаване на концентрацията на изследваните проби от 15 до 30 µg/ml се наблюдава значително нарастване на активността. Сред смесите от мастни киселини, тези, получени след култивиране при 15°C имат най-високата инхибираща активност със стойности на ИК₅₀ от 18.1 и 18.8 µg/ml съответно при ниско и високо осветяване. При ниската светлинна интензивност, температурата на култивиране не оказва значителен ефект върху активността на масните киселини. При високото осветяване обаче, пробата от 34°C има най-висока стойност на ИК₅₀ (23.2 µg/ml), следвана от пробата, получена при 40°C. Влиянието на светлинната интензивност е значително при 34°C (P<0.001), с по-висока активност на масните киселини, получени при ниско осветяване.

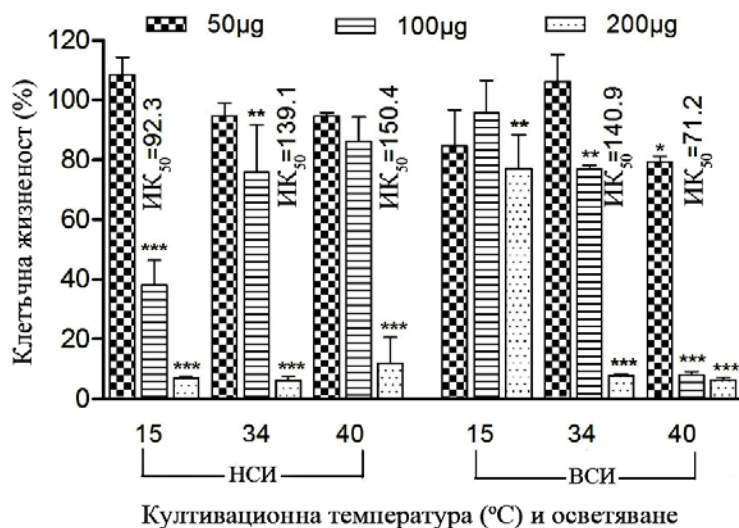


Фиг. 12. Влияние на температурата на растеж, осветяването и възрастта на културата върху токсичността на извънклетъчните полизахариди на *Gloeocapsa* sp. R-06/1 към HeLa клетки. Жизнеността на HeLa клетките след 24 часово въздействие с различни концентрации на ЕПЗХ спрямо жизнеността на контролни нетретирани клетки (100%) беше установена чрез МТТ метод. Противораковото лекарство доксорубицин хидрохлорид (DOX, 10 µg/ml) бе използвано като положителна контрола. Всички концентрации са в µg/ml. **А**, екзополisahариди, получени при ниско осветяване, ст ф - екзополisahариди от култура в стационарна фаза (30°C, НСИ); **Б**, проби, получени при високо осветяване. Концентрацията, необходима за 50% потискане на клетъчния растеж е обозначена с ИК₅₀.



Фиг. 13. Зависимост на ефекта на мастни киселини от *Gloeocapsa* sp. върху жизнестта на HeLa клетки от култивационната температура и нивото на осветяване.

Етанолните извлеци от *Gloeocapsa* sp., получени след култивирането ѝ при три температури и две светлинни интензивности, потискат растежа на HeLa клетките (Фиг. 14) и този ефект е концентрационно-зависим (приложени са три концентрации – 50, 100 и 200 µg/ml). С повишаване на култивационната температура, при високо осветяване активността на екстрактите нараства, докато при ниско осветяване намалява. Пробите получени при 40°C, ВСИ и 15°C, НСИ, най-силно понижават процента на живите туморни клетки ($IC_{50}=71.2$ µg/ml и $IC_{50}=92.3$ µg/ml, съответно).



Фиг. 14. Ефект на етанолни извлеци от *Gloeocapsa* sp., култивирана при различни температури и светлинна интензивност, върху жизнестта на HeLa клетки.

3.3. Антибактериална и антигъбна активност на *Synechocystis* sp. R 10

Изследвана е биологичната активност на клетъчни (воден екстракт, смес от мастни киселини) и извънклетъчни (културална течност и полизахариди) вещества на *Synechocystis* sp., култивиран 4 дни при различните температури и осветяване. За биологична активност е изследвана също култура, расла 14 дни при 32°C, НСИ.

Резултатите за антибактериална и антигъбна активност са представени в Таблица 3. От водните екстракти само пробите, изолирани след култивиране на цианобактерията при 26, 32 и 39°C, НСИ, показват антибактериална активност срещу *Pseudomonas aeruginosa*, което предполага, че само при тези условия водорасловите клетки синтезират вещества, потискащи растежа на Грам-отрицателната бактерия. Температурата (в границите 26-39°C) не оказва влияние върху синтеза на активни вещества, тъй като минималната инхибираща концентрация на трите проби е една и съща (12.5 mg/ml). Удължаване на култивирането при 32°C, НСИ доведе до разширяване на антимикробния спектър и повишаване на активността. Екстрактът от стационарна култура е активен срещу *Staphylococcus aureus* и *Bacillus cereus* (с МИК от 6.25 mg/ml) и срещу *Yersinia enterocolitica* и *Candida albicans*, с МИК от 1.56 mg/ml (в таблицата са включени данните само за показалите активност водни екстракти). Масните киселини изолирани от *Synechocystis* sp. R10, култивиран при 20, 32 и 39°C, проявяват силен инхибиращ ефект върху изследваните тест-бактерии (МИК от 1.25 и 2.5 mg/ml) и гъбата *Candida albicans* (МИК от 1.25 mg/ml) - (Табл. 3). Само пробата, изолирана след култивиране при 39°C, НСИ, не е активна срещу *Streptococcus pyogenes* и *Escherichia coli*. Културалните течности потискат растежа на всички тест организми, като определените МИК варират от 12.5 до 3.12 mg/ml както на дадена проба за отделните патогени, така и между някои от пробите, но без ясно изразена тенденция. Широкият антипатогенен спектър и разликата в степента на активност са указание за синтеза и отделянето в културалните среди на различни количества и/или разнообразни биоактивни съединения. Най-податлива на въздействие е Грам-положителната бактерия *Staphylococcus aureus*, с най-ниска МИК на културалната среда от *Synechocystis* sp., култивиран при 26, 32 и 39°C, НСИ. Между изследваните цианобактериални компоненти с най-висока активност са извънклетъчните полизахариди (МИК от 1 до 0.25 mg/ml). Най-чувствителни към тяхното действие са Грам-отрицателните бактерии *Yersinia enterocolitica* и *Pseudomonas aeruginosa* и особено гъбата *Candida albicans*, докато *Streptococcus pyogenes* е резистентен (Табл. 3). Само екзополизахаридът, изолиран от *Synechocystis* sp. култивиран при 26°C, НСИ, потиска растежа на всички тествани патогени, с изключение на *Streptococcus pyogenes*. Пробите, получени при 26 и 32°C, НСИ и ВСИ, са с по-широк антипатогенен спектър от останалите ЕПЗХ проби. В сравнение с ВСИ, НСИ стимулира активността на тези проби срещу *Yersinia enterocolitica*.

Таблица 3. Антибактериална и антигъбна активности на воден екстракт, мастни киселини, културална течност и екзополисахариди от *Synechocystis* sp. R10, култивиран при различни условия, представени като минимална инхибираща концентрация (МИК, mg/ml).

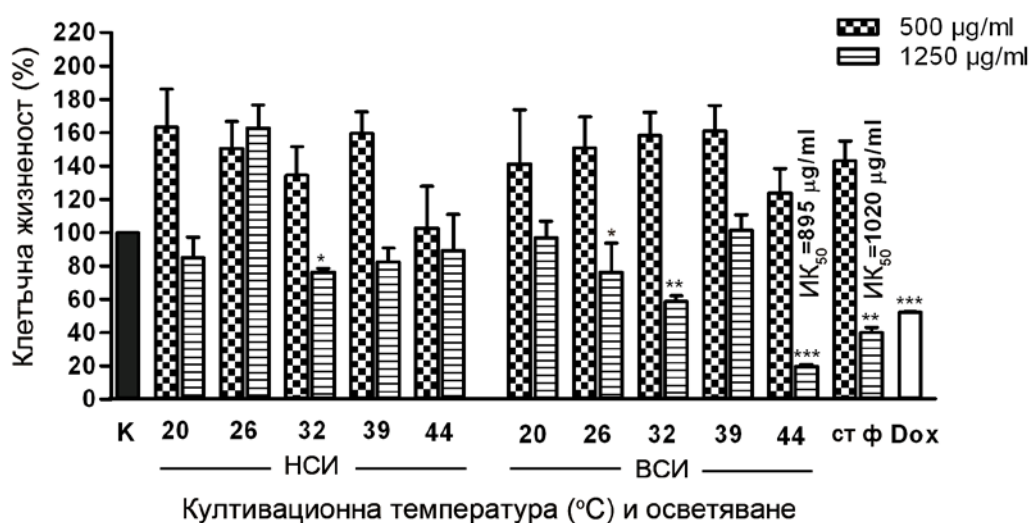
Проба/Тест патоген	S. aureus	S. pyogenes	B. cereus	E. coli	P. aeruginosa	Y. enterocolitica	S. typhimurium	C. albicans
Водни екстракти								
26°C, НСИ	0	0	0	0	12.5	0	0	0
32°C, НСИ	0	0	0	0	12.5	0	0	0
39°C, НСИ	0	0	0	0	12.5	0	0	0
стац. фаза	6.25	0	6.25	0	12.5	1.56	0	1.56
Мастни киселини								
20°C, НСИ	1.25	2.5	-	-	-	-	-	-
32°C, НСИ	1.25	2.5	-	-	-	-	-	1.25
39°C, НСИ	2.5	0	-	0	-	-	-	-
стац. фаза	1.25	1.25	2.5	1.25	-	-	-	1.25
20°C, ВСИ	1.25	2.5	-	-	-	2.5	-	-
32°C, ВСИ	1.25	2.5	-	-	-	-	-	1.25
39°C, ВСИ	10.0	1.25	-	1.25	-	-	-	1.25
Културална среда								
20°C, НСИ	6.25	6.25	12.5	12.5	12.5	0	12.5	6.25
26°C, НСИ	3.12	6.25	6.25	12.5	12.5	6.25	12.5	6.25
32°C, НСИ	3.12	6.25	6.25	12.5	12.5	6.25	12.5	6.25
39°C, НСИ	3.12	6.25	6.25	12.5	12.5	6.25	12.5	6.25
44°C, НСИ	12.5	12.5	6.25	6.25	12.5	6.25	6.25	12.5
стац. фаза	6.25	0	12.5	12.5	12.5	6.25	12.5	12.5
20°C, ВСИ	6.25	12.5	6.25	6.25	12.5	6.25	6.25	12.5
26°C, ВСИ	6.25	12.5	12.5	12.5	12.5	6.25	12.5	6.25
32°C, ВСИ	6.25	12.5	6.25	12.5	12.5	6.25	12.5	6.25
39°C, ВСИ	6.25	12.5	6.25	6.25	12.5	6.25	12.5	6.25
44°C, ВСИ	6.25	12.5	6.25	12.5	12.5	6.25	0	12.5
Екзополисахариди								
20°C, НСИ	0	0	0	0	1.0	0	0	0
26°C, НСИ	0.5	0	1.0	1.0	1.0	0.5	1.0	0.25
32°C, НСИ	0	0	0	0	0	0.5	0	1.0
39°C, НСИ	0	0	0	0	0	0	0	1.0
44°C, НСИ	0	0	0	0	0	0	0	0.5
20°C, ВСИ	0	0	0	0	1.0	0	0	1.0
26°C, ВСИ	0	0	0	0	1.0	1.0	0	0.25
32°C, ВСИ	1.0	0	0	0	1.0	1.0	0	1.0
39°C, ВСИ	0	0	0	0	0	0	0	0
44°C, ВСИ	0	0	0	0	0	0.25	0	0

“0” – няма инхибиращ ефект; “-” не е изследвано

3.4. Активност на *Synechocystis* sp. R10 срещу HeLa клетки

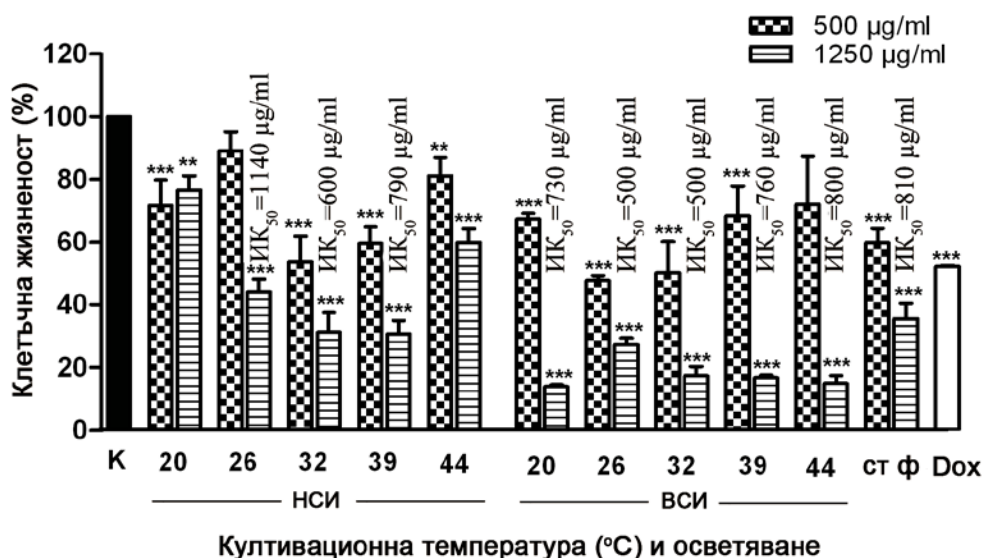
Водните екстракти и културалните течности на *Synechocystis* sp. R10 са приложени в две концентрации – 500 и 1250 µg/ml. Ниската концентрация на водните екстракти от клетки, култивирани при различните условия, показва стимулиращ

растежа на HeLa клетките ефект (Фиг. 15). При ВСИ, с покачване на температурата нараства инхибиращото въздействие на високите концентрации на изследваната смес от вътреклетъчни метаболити (с изключение на 39°C, където се забелязва слабо стимулиране) и при 44°C то достига 80% (ИК₅₀=895 µg/ml). При НСИ, само хомогенатът (в концентрация 1250 µg/ml) от културата, расла при 32°C, статистически значимо понижава жизнеността на туморните клетки. Инхибиращият ефект значително нараства при удължаване времето на култивиране на цианобактерията (от 23.7% за хомогената от експоненциална култура на 60% за този от стационарна култура).

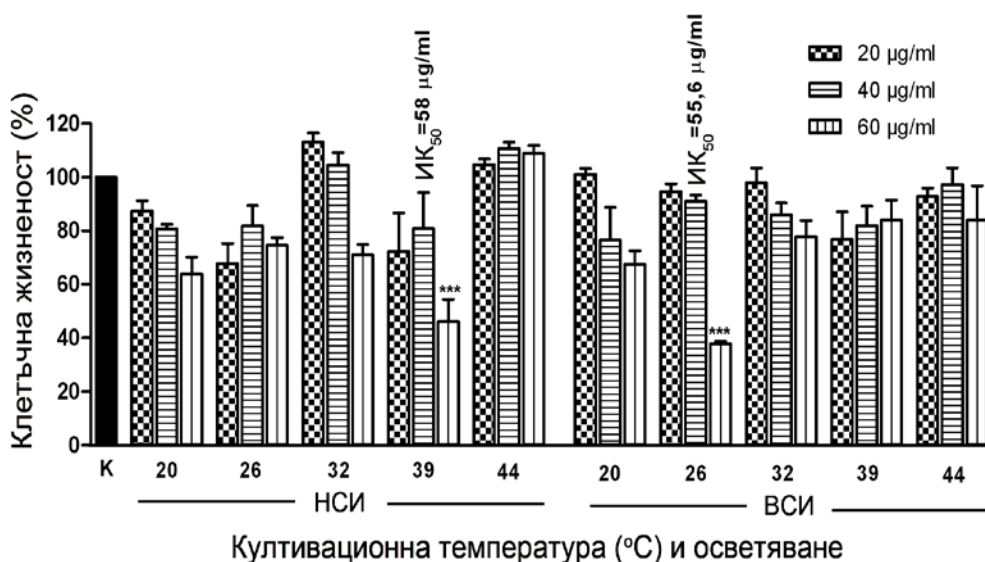


Фиг. 15. Ефект на воден клетъчен екстракт от *Synechocystis* sp. R10, култивиран при посочените температури и осветяване върху жизнеността на HeLa клетки. Dox - 10 µg/ml доксорубицин (положителна контрола). Ст ф – екстракт от култура в стационарна фаза (32°C, НСИ). ИК₅₀, концентрацията, необходима за 50% инхибиране на растежа на туморните клетки. *P<0.05, **P<0.01 и ***P<0.001 показват значителна разлика от контролните (К, нетретирани клетки) стойности.

За разлика от водните клетъчни екстракти, културалната течност от *Synechocystis* sp. R10, отглеждан при всяко от изследваните условия на средата, потиска растежа на HeLa клетките и този ефект е концентрационно-зависим (Фиг. 16). При ниско осветяване, с повишаване на култивационната температура в областта 20-39°C, жизнеността на туморните клетки намалява от 77 до 31% при концентрация на пробите от 1250 µg/ml. Най-ниска е стойността на ИК₅₀ (600 µg/ml) на пробата, получена при 32°C. По-продължителното култивиране при 32°C, НСИ не повлиява значително активността на културалната течност срещу HeLa. В сравнение с ниското, високото осветяване стимулира продукцията и/или разнообразието на извънклетъчни вещества с инхибиращо въздействие, което намира отражение в по-ниски стойности на ИК₅₀. Най-активни сред пробите при ВСИ са тези, получени след култивиране при 26 и 32°C.



Фиг. 16. Влияние на култивационната температура и нивото на осветяване върху потискащата растежа на HeLa клетки активност на културална течност от *Synechocystis* sp. R10.

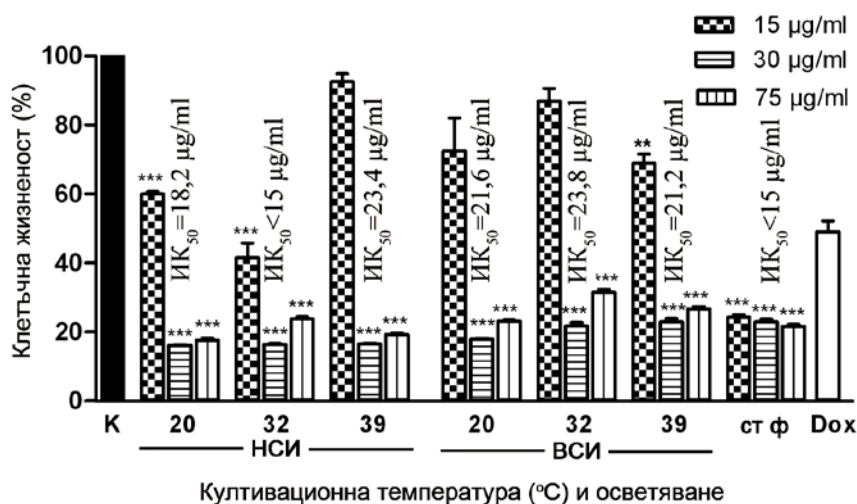


Фиг. 17. Жизненост на HeLa клетки, третиран с посочените концентрации на извънклетъчни полизахариди на *Synechocystis* sp. R10, изолирани след култивиране на водораслото при различни температури и осветяване.

Извънклетъчните полизахариди на *Synechocystis* sp., приложени в концентрации от 20, 40 и 60 µg/ml, показват по-слаб инхибиращ ефект (Фиг. 17) в сравнение с ефекта на ЕПЗХ от *Gloeocapsa* sp. (Фиг. 12). Значителна е активността на пробите, изолирани след култивиране на водораслото при 26°C, ВСИ и 39°C, НСИ, със стойности на ИК₅₀ съответно от 55.6 и 58 µg/ml.

Мастните киселини, изолирани от *Synechocystis* sp. R10, култивиран при три различни температури (20, 32 и 39°C) и двете светлинни интензивности, оказват силен потискащ ефект върху растежа на HeLa клетките (Фиг. 18). Стойностите на ИК₅₀ варират от по-малко от 15 µg/ml до 23.8 µg/ml в зависимост от култивационната

температура и осветяване. При 20 и 32°C, с по-висока активност са мастните киселини, синтезирани при НСИ, в сравнение с ВСИ. Пробите, получени при 32°C, НСИ от култури в експоненциална и стационарна фаза, най-силно намаляват жизнеността на туморните клетки ($ИК_{50} < 15 \mu\text{g/ml}$).



Фиг. 18. Влияние на култивационната температура и нивото на осветяване върху способността на смес от мастни киселини от *Synechocystis* sp. R10 да потискат растежа на HeLa клетки.

Анализът на резултатите от изследванията относно влиянието на култивационните условия върху биологичната активност на *Gloeocapsa* sp. показва, че субоптималните температури (15-26°C) стимулират антибактериалната активност на извънклетъчните й полизахариди и активността срещу HeLa клетки на екзополisahаридите и мастните киселини. При ниски температури в комбинация с НСИ се усилва антибактериалният ефект на мастните киселини и цитотоксичността на етанолните извлекци на *Gloeocapsa* sp. В сравнение с ВСИ, ниското ниво на осветяване стимулира синтеза на цитотоксични хидрофилни вътреклетъчни вещества, докато ефектът върху веществата с антигъбно действие е противоположен. Само при етанолните извлекци се наблюдава най-висока цитотоксичност след култивиране на водораслото при 40°C, ВСИ. По-продължителното култивиране на *Gloeocapsa* sp. води до разширяване на спектъра на чувствителните към водния клетъчен извлек бактерии, най-висока антибактериална и антигъбна активност на ЕПЗХ, както и до повишаване на цитотоксичността на ЕПЗХ. Цитотоксичното действие на водните екстракти обаче е понижено. Като цяло, ниските температура и осветяване значително повишават биологичната активност на *Gloeocapsa* sp. Този факт вероятно е свързан със задействането на механизми за преодоляване на неблагоприятните условия, включващи синтезирането на по-голямо количество и/или разнообразни съединения.

Synechocystis sp. R10, култивиран при 26 и 32°C (температури, които са оптимални при НСИ), показва най-висока биологична активност. Екзополisahаридите, изолирани след култивиране при 26°C, НСИ и при 26 и 32°C, ВСИ, инхибират растежа на най-голям брой патогени. Само цитотоксичността на водните екстракти и полизахаридите е по-висока при по-високите култивационни температури (съответно 44°C при ВСИ и 39°C при НСИ). Ниското осветяване стимулира антибактериалната активност на водните клетъчни екстракти и екзополisahаридите на водораслото, както

и инхибиращия растежа на HeLa клетките ефект на мастните му киселини. За разлика, цитотоксичността на водните екстракти и културалните среди е по-висока след култивиране при ВСИ в сравнение с НСИ. При по-продължително култивиране се наблюдава разширяване на антимикробния спектър и повишаване на активността срещу микроби и HeLa на вътреклетъчните водоразтворими метаболити, докато отделените в средата вещества са с по-слаб антимикробен потенциал в сравнение с пробите от експоненциална фаза на растеж.

Ефектът на изследваните физиологични фактори върху биологичната активност на *Synechocystis* sp. се различава от наблюдавания при *Gloeocapsa* sp. Тази разлика вероятно е свързана с установените специфични промени в клетъчния метаболизъм, както и с включването на различни защитни механизми при двата цианопрокариота. Като се има предвид толерантността към широк диапазон от температури при двата светлинни режима, разкрита от *Gloeocapsa* sp. и *Synechocystis* sp., може да се предположи участието на някои от биоактивните съединения в механизмите на тази толерантност.

Най-същественият извод с практическа насоченост от тази група изследвания е, че чрез прилагане на подходящи култивационни условия може значително да се повиши биологичната активност на вътреклетъчните и извънклетъчни вещества на *Gloeocapsa* sp. и *Synechocystis* sp. R10, което е от несъмнен биотехнологичен интерес.

4. Промени в качествения и/или количествен състав на мастните киселини и екзополisahаридите на *Gloeocapsa* sp. R-06/1 в зависимост от условията на култивиране и значение на тези промени

4.1. Промени в съдържанието на мастните киселини на *Gloeocapsa* sp. в отговор на различен температурен и светлинен режим на култивиране

Мастнокиселинният състав на *Gloeocapsa* sp. е близък до този на повечето цианопрокариоти. Основните мастни киселини са: палмитинова (16:0), палмитолеинова (16:1), стеаринова (18:0), олеинова (18:1), линолова (18:2) и α -линоленова (α -18:3). Промяната на култивационната температура и осветяване не повлиява качествения мастнокиселинен състав, но относителното съдържание на отделните мастни киселини, с изключение на 16:0, се променя (Табл. 4). При температура на отглеждане 15°C количеството на 18:3, 18:0 (при двете светлинни интензивности) и 18:1 (при НСИ) нараства в сравнение с количеството на същите мастни киселини при температура на отглеждане на културата 34°C, докато останалите мастни киселини количествено намаляват. При 38°C, ВСИ се откроява значително нарастване на сравнителното съдържание на 16:1 и намаляване на количеството на 14:0 и 16:2, докато при същата температура при НСИ процентът на 18:3 значително намалява в сравнение с 34°C. При постоянна температура от 38° С НСИ значително стимулира натрупването на 16:0 и намалява съдържанието на 18:3 в сравнение с ВСИ. При 34°C количеството на 16:1 е повече от три пъти по-високо при НСИ, отколкото при ВСИ.

Таблица 4. Промени в относителното съдържание на основните мастни киселини при *Gloeocapsa* sp. R-06/1, в отговор на култивационната температура и осветяване.

Мастна киселина	Температура (°C) и осветяване					
	15	34	38	15	34	38
	132 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ (НСИ)			2×132 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ (ВСИ)		
14:0	0.5±0.2 a	0.9±0.3 a	1.4±0.5 a	0.7±0.3 a	1.7±0.5 b	0.6±0.2 a
16:0	28.5±4.0 a	29±3.0 a	31.6±4.0 a●	26.2±2.3 a	28.2±2.0 a	24.1±3.0 a■
16:1	1.6±0.1 a	4.2±1.0 b●	4.3±0.8 b	1.5±0.2 a	1.3±0.4 a■	5.1±1.3 b
16:2	1.7±0.5 a	12.3±3.0 b	8.0±2.0 b	1.7±0.4 a	9.2±1.2 b	5.7±1.0 c
18:0	14.9±2.1 a	7.3±1.0 b	7.6±1.5 b	16.5±3.1 a	7.5±0.9 b	5.6±0.8 b
18:1	10.8±1.0 a	6.2±1.3 b	9.2±1.2 ab	9.8±1.5 a	6.9±0.9 a	9.2±1.6 a
18:2	17.4±3.0 a	28.6 ± 3.5b	32.7 ± 4.0b	18.3a ± 2.0a	32 ± 4.0b	34.7 ± 4.2b
α18:3	24.6±2.7 a	11.5±1.7 b	5.2±1.3 c●	25.3±2.3 a	13.2±1.8 b	15±3.0 b■

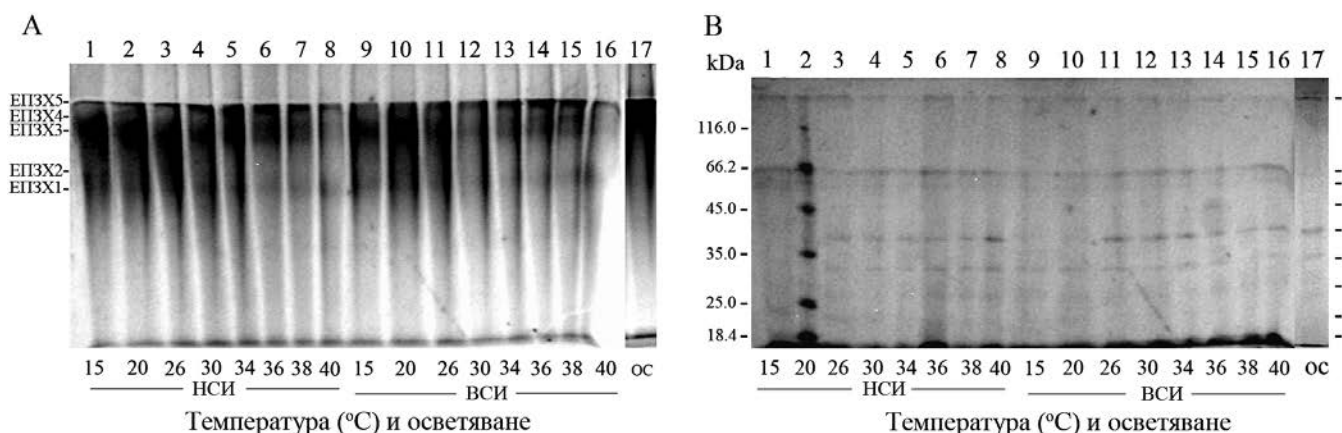
Съдържанието на мастните киселини е изразено като процент от общите мастни киселини. Представени са средните стойности ± стандартното отклонение от трикратни анализи. Стойностите за всяка конкретна мастна киселина, отбелязани с различни букви, се различават значително ($P < 0.05$) между различните температури за специфичен интензитет на светлината. Различните символи (■, ●) показват значимите разлики за всяка мастна киселина при една и съща температура между НСИ и ВСИ.

4.2. Промени в съдържанието и състава на екзополизахаридите на *Gloeocapsa* sp. в отговор на различен температурен и светлинен режим на култивиране и фазата на растеж

За да изследваме промените в съдържанието и състава на ЕПЗХ, използвахме интересен и нестандартен метод – оцветяване на ЕПЗХ след електрофореза в полиакриламиден гел (SDS-PAGE). Инкубирането на гела в разтвор на алцианово синьо показва наличието и профила на полизахаридите в пробите, изолирани след култивиране при различни условия (Фиг. 19А). Във всички проби се наблюдават четири групи екзополизахариди (ЕПЗХ1, 3, 4 и 5), с различаваща се подвижност в гела. При 15 и 20°C, НСИ и 20 и 26°C, ВСИ се появява допълнителна полизахаридна ивица (ЕПЗХ2). Екзополизахаридните групи са номерирани в съответствие с намаляващата им електрофоретична подвижност. Интензивността на всяка ивица варира между третиранията, показвайки, че общото съдържание на полизахариди и съотношението между полизахаридните групи се променя в зависимост от температурата, светлинната интензивност и култивационния период. Появата на допълнителна полизахаридна група, както и променящото се съотношение между четирите групи ЕПЗХ в отговор на промяна на култивационните условия, са указание за наличието както на количествени, така и на качествени промени в ЕПЗХ.

Както се вижда на Фиг. 19А, с покачване на растежната температура, количеството на ЕПЗХ на *Gloeocapsa* sp. намалява. Най-голямо количество високомолекулни екзополизахариди се отделят в стационарна фаза на растеж (Фиг. 19А, старт 17). Повишеното отделяне на полизахариди в средата вероятно се дължи на изчерпването на хранителни вещества (главно на азота и фосфора) в хода на развитието на водораслите (Staats et al., 2000; Banerjee et al., 2002; Magaletti et al., 2004; Yang et al.,

2012). Смята се, че така клетките се „освобождават“ от излишъка от фиксиран въглерод, произведен в резултат на нарушеното равновесие във въглерод-азотния метаболизъм (Otero & Vincenzini, 2004).



Фиг. 19. Електрофоретично характеризиране на екзополисахаридния комплекс на *Gloeocapsa* sp., култивирана при различни температури и два светлинни режима. (А), Оцветяване на ЕПЗХ (50 µg въглехидрати/старт) с алцианово синьо след SDS-PAGE в 10% гел. Полизахаридните групи (ЕПЗХ1-5) са номерирани по реда на намаляващата им подвижност в гела. (В), паралелен гел, оцветен със Coomassie Blue, показващ полипептидния състав на комплекса (полипептидите са посочени с чертичка отдясно). Старт 17 – проба от култура в стационарна фаза.

Инкубирането на паралелен гел в разтвор на Coomassie blue визуализира присъствието и профила на полипептиди в ЕПЗХ проби (Фиг. 19В). Във всички проби, изолирани след култивиране при различните условия, се наблюдават осем дискретни ивици с молекулно тегло от 18 до 149 kDa (18, 22, 26, 32, 38, 57, 63 и 149). При 26 и 30°C, НСИ и 36°C, ВСИ се забелязва и 46 kDa ивица. Въпреки че профилът им е сходен, интензивността на полипептидните ивици се променя в зависимост от третирането. Наличие на белтъци е установено в почти всички изследвани цианобактериални екзополисахариди. Както при *Gloeocapsa* sp., тяхното количество варира до голяма степен в зависимост от условията на култивиране (De Philippis & Vincenzini 1998; Hu et al., 2003).

Резултатите от тази група изследвания показаха промени в относителното количество на основните мастни киселини, както и количествени и качествени промени в екзополисахаридите при култивиране на *Gloeocapsa* sp. при различни условия. Наблюдаваните промени са свързани с изявата на биологичната активност на тези биомолекули. В случая с мастните киселини на *Gloeocapsa* sp., в най-активните проби (15°C, НСИ и 15°C, ВСИ, Фиг. 13) количеството на алфа-линоленовата и стеаринова киселина е по-високо в сравнение с другите проби (Табл. 4), което предполага участието на тези мастни киселини в биологичната активност, още повече, че антибактериалният потенциал на алфа-линоленовата и стеаринова киселина е известен (Mundt et al., 2001; Ohta et al., 1995), както и антитуморното действие на алфа-линоленовата киселина (Kumar & Das, 1997; Menendez et al., 2004). Благоприятно въздействие върху биологичната активност вероятно оказва и съотношението между всички мастни киселини в състава на най-активните проби. ЕПЗХ, произведени при 15 и 20°C при двете нива на осветяване, показаха най-ниските стойности на МИК за целевите патогени. Цитотоксичността на ЕПЗХ, приложени в едни и същи

концентрации (изравнени по съдържанието на общите въглехидрати), значително нараства при култивационни температури от 15-20°C, НСИ и 20-26°C, ВСИ, като ЕПЗХ, произведени при 20°C, са с максимална активност срещу HeLa клетките (до 85% потискане на растежа). По-високата активност вероятно е свързана с по-голямото количество на високомолекулни ЕПЗХ в екзополизахаридния комплекс, получен при тези условия (Фиг. 19). Може да се предположи влиянието и на промени в състава на захарите и/или съдържанието и състава на белтъците в комплекса. Неотдавна бе показано, че количеството и състава на капсуларните полизахариди (КПЗХ) на *Gloeocapsa gelatinosa* варира в зависимост от фазата на растеж и условията на култивиране. При ниска светлинна интензивност производството на КПЗХ намалява, като същевременно се увеличава количеството на кисели захари (Ruangsomboon et al., 2006). Редица проучвания показаха участие на извънклетъчните протеини в биологичната активност. Например Garbacki et al. (2000) установяват, че при премахване на белтъците от капсуларните полизахариди на два щама *Phormidium* противовъзпалителните свойства на КПЗХ се увеличават; антитуморната активност на гликопротеин, получен от *Chlorella vulgaris*, се дължи на белтъчната част (Noda et al., 1998). За да потвърдим, че активността на ЕПЗХ комплекс на *Gloeocapsa* sp. срещу HeLa клетки е свързана с полизахаридната част на комплекса, две от пробите ЕПЗХ бяха депротеинизирани под действието на протеиназа К и тествани в доза от 40 µg/ml. Депротеинизираният ЕПЗХ понижава до голяма степен жизнеспособността на HeLa клетките, с нива на инхибиране равни на тези, получени след прилагане на 40 µg/ml от съответните не-депротеинизирани ЕПЗХ комплекси.

Поради важните биологични функции и съществената екологична роля на мастните киселини и екзополизахаридите на цианопрокариотите може да се предположи, че наблюдаваните качествени и/или количествени промени в тези биомолекули са част от механизмите на приспособяване на *Gloeocapsa* sp. към различните условия и спомагат за преодоляване на неблагоприятни фактори на средата.

От друга страна, нашето проучване показва, че качествения състав и/или количеството на ценни, перспективни микроводораслови метаболити може да се манипулира в желаната посока чрез промяна на условията на култивиране.

В заключение можем да кажем, че новоизолираните български щамове *Gloeocapsa* sp. R-06/1 и *Synechocystis* sp. R10 са перспективни продуценти на вещества със значително антибактериално, антигъбно и цитотоксично действие. Лесното отделяне на биомасата от културалната течност, бързият растеж, високата физиолого-биохимична пластичност и установената възможност да се повиши допълнително биологичната активност на техни вътреклетъчни и извънклетъчни метаболити под влияние на култивационната температура и светлинна интензивност и фазата на растеж подчертават биотехнологичния потенциал на тези микроводорасли.

ИЗВОДИ

1. Големият дял на българските изолати със значителна биологична активност сред изследваните щамове показва потенциала на микроводораслите от местни местообитания и важността на продължаване и задълбочаване на проучването им.

2. От изследваните 20 щама микроводорасли, новоизолираните български щамове *Gloeocapsa* sp. R-06/1 и *Synechocystis* sp. R10 синтезират най-голямо разнообразие от вещества с антибактериално, антигъбно и цитотоксично действие, проявяват най-широк спектър на антимикробна активност и често най-висока активност.

3. *Gloeocapsa* sp. R-06/1 и *Synechocystis* sp. R10 поддържат добър растеж и продуктивност в широк температурен обхват при две светлинни интензивности.

4. *Gloeocapsa* sp. R-06/1 и *Synechocystis* sp. R10 показват висока приспособимост и способност да включват различни, но ефективни механизми за преодоляване на неблагоприятните условия на средата. Активиране на специфични каскади от антиоксидантни ензими, повишаване активността на отделни изоформи на антиоксидантни ензими и протеази, качествени и/или количествени промени в синтезираните белтъци, въглехидрати, пигменти, липиди и мастни киселини са част от механизмите за температурната им толерантност.

5. Като цяло, култивирането на *Gloeocapsa* sp. R-06/1 при ниски температури (15-26°C) и светлинна интензивност (132 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$), а на *Synechocystis* sp. R10 при 26-32°C значително повишава биологичната им активност. В стационарна фаза на растеж, при *Gloeocapsa* sp. се наблюдава по-широк спектър на чувствителните към водния й клетъчен извлек бактерии, най-висока антибактериална и антигъбна активност и повишена цитотоксичност на ЕПЗХ, а при *Synechocystis* sp. нараства активността на вътреклетъчните водоразтворими метаболити срещу микроби и HeLa клетки.

6. Степента на биологична активност на екзополизахаридите и мастните киселини на *Gloeocapsa* sp. R-06/1 е свързана с качествени и/или количествени промени на тези метаболити в отговор на промяна на култивационните условия.

7. Високите биологични активности *in vitro* на суровите екстракти и особено на екзополизахаридите и мастните киселини на *Gloeocapsa* sp. R-06/1 и *Synechocystis* sp. R10 ги правят подходящи за бъдещи по-детайлни изследвания, с оглед на потенциално терапевтично приложение.

ПРИНОСИ

1. Изолирани са и се поддържат в сбирката на секция Експериментална алгология на ИФРГ – БАН пет нови български щама микроводорасли (*Gloeocapsa* sp. R-06/1, *Synechocystis* sp. R10, *Chlorella* sp. R-06/2, *Coelastrella* sp. IOC и 3B 1).

2. Проучени и сравнени са възможностите на 20 щама микроводорасли да произвеждат вещества с биологична активност, насочена срещу патогенни Грам-положителни, Грам-отрицателни бактерии и гъба, както и срещу туморни HeLa клетки. Установени са висок биотехнологичен потенциал и перспективност на два новоизолирани български щама цианопрокариоти, *Gloeocapsa* sp. R-06/1 и *Synechocystis* sp. R10.

3. Установени са условия на култивиране, при които биологичната активност на екстракти и метаболити от *Gloeocapsa* sp. R-06/1 и *Synechocystis* sp. R10 е значително стимулирана (по-широк спектър на действие и/или по-висока активност), което е от несъмнен биотехнологичен интерес.

4. Установено е, че *Synechocystis* sp. R10 е изключително добър и перспективен продуцент на фикобилипротеини - С-фикоцианин и алофикоцианин.

5. Установено е, че полизахаридният компонент е отговорен за активността на екзополisahаридния комплекс на *Gloeocapsa* sp. R-06/1 срещу HeLa клетки.

6. Определени са границите на температурна толерантност на *Gloeocapsa* sp. R-06/1 и *Synechocystis* sp. R10, при две нива на осветяване, и са разкрити механизми на тази толерантност. Придобитите познания са полезни и приложими в бъдещи биотехнологични разработки.

7. За първи път е характеризиран изоензимният профил на основни антиоксидантни ензими (SOD, CAT, POD и GR), протеази и естерази на *Gloeocapsa* sp. R-06/1 и *Synechocystis* sp. R10 и са установени промените в активността на тези ензими, в отговор на различни култивационни температури, светлинни интензивности (*Gloeocapsa* sp. и *Synechocystis* sp.) и възраст на културата (*Synechocystis* sp.). Установен е специфичен отговор на отделните изоформи на определен ензим.

Показана е приложимостта на метода “оцветяване в гел за естеразна активност” за оценка на промените в метаболитната активност в отговор на различни култивационни условия.

СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ ВЪВ ВРЪЗКА С ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА

Gacheva G., L. Gigova, N. Ivanova, I. Iliev, R. Toshkova, E. Gardeva, V. Kussovski & H. Najdenski. 2012. Suboptimal growth temperatures enhance the biological activity of cultured cyanobacterium *Gloeocapsa* sp. Journal of Applied Phycology, DOI: 10.1007/s10811-012-9852-y (IF2011 – 2.411)

Гъчева Г., Н. Иванова, И. Илиев, П. Пиларски, Р. Тошкова, Е. Гърдева, Л. Йосифова, И. Цветкова, В. Късовски, Х. Найденски & Л. Гигова. 2012. Влияние на култивационните условия върху производството и биологичната активност на ценни метаболити от цианопрокариота *Synechocystis* sp. R10. В: Сборник на VII национална конференция по ботаника, 29-30 септември 2011 г. София, стр. 485-496.

Gigova L., **G. Gacheva**, N. Ivanova & P. Pilarski. 2012. Effects of temperature on *Synechocystis* sp. R10 (Cyanoprokaryota) at two irradiance levels. I Effect on the growth, biochemical composition and defense enzyme activities. Genetics and Plant Physiology, 2 (1-2), (in press).

УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ

Gacheva G., P. Pilarski, R. Andreeva, N. Ivanova, E. Gardeva, L. Yossifova, R. Toshkova, L. Gigova. 2009. Characterization of a Bulgarian strain of *Gloeocapsa* sp. in respect to its potential biotechnological use. In: XI National Conference on Plant Physiology, 19-20 November, 2009, Sofia, Bulgaria.

Найденски Х., И. Цветкова, М. Нинова, В. Късовски, **Г. Гъчева**, И. Илиев, Н. Иванова, П. Пиларски, Г. Петков & Л. Гигова. 2010. Антибактериална и антигъбна активност in vitro на различни видове и щамове микроводорасли. XII Конгрес на микробиолозите в България, 11-15.10.2010 г., Юндола.

Гъчева Г., Н. Иванова, И. Илиев, П. Пиларски, Р. Тошкова, Е. Гърдева, Л. Йосифова, И. Цветкова, В. Късовски, Х. Найденски & Л. Гигова. 2011. Влияние на култивационните условия върху производството и биологичната активност на ценни метаболити от цианопрокариота *Synechocystis* sp. R10. VII Национална Конференция по Ботаника, 29-30 септември 2011 г, София, България. Секционни доклади, стр. 485-496.

Илиев И., **Г. Гъчева**, Л. Гигова, Г. Петков, Р. Тошкова, Е. Гърдева, Л. Йосифова, Х. Найденски & В. Късовски. 2011. Биологична активност на мастни киселини от *Gloeocapsa* sp. (Cyanoprokaryota), отглеждан при различни условия. VII Национална Конференция по Ботаника, 29-30 септември 2011 г, София, България, Секционни доклади, стр. 477-483.

Gacheva G., E. Gardeva, L. Yossifova, I. Iliev, R. Toshkova, N. Ivanova, P. Pilarski & L. Gigova. 2012. Screening of new Bulgarian microalgal strains for antitumor activity. Conference on "Natural anticancer drugs", 30.06. – 04.07. 2012, Olomouc, Czech Republic. Biomed. Papers, 156 (1): S67-S68.