



БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ

ИНСТИТУТ ПО ФИЗИОЛОГИЯ НА РАСТЕНИЯТА И ГЕНЕТИКА

Светослав Димитров Александров

**Биотехнологични възможности на
водораслото *Trachydiscus minutus***

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация

за присъждане на образователната и научна степен „Доктор”

Научна специалност

01.06.16. – Физиология на растенията

Научен ръководител: проф. дбн Георги Петков

Рецензенти:

доц. д-р Ирина Пунева

доц. д-р Ганка Чанева

София, 2015

Дисертацията е написана на 104 печатни страници и е онагледена с 20 фигури и 14 таблици. Списъкът на цитираната литература включва 137 източника, от които 11 на кирилица.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 9 април 2015 г. от 10:00 ч. 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, № 200/06.03.2015, в състав:

Вътрешни членове:

доц. д-р Ирина Пунева

проф. дбн Георги Петков

Външни членове:

проф. д-р Емилия Апостолова

доц. д-р Милена Попова

доц. д-р Ганка Чанева

Материалите по защитата са на разположение в библиотеката на ИФРГ-БАН, ул. „Акад. Г. Бончев”, бл. 21, ет. 2, стая 225

БЛАГОДАРНОСТИ

Сърдечно благодаря на научния си ръководител проф. дбн Георги Петков за голямата помощ при изготвянето на дисертационния труд.

Благодаря на колегите от секция „Експериментална алгология” при ИФРГ-БАН за ценната им подкрепа.

Благодаря на колегите от ИОХЦФ-БАН за извършената работа по ГХ/МС анализ и за любезно предоставените данни, които са представени в настоящия дисертационен труд.

Издавам специални благодарности към проект:



Подкрепа за изграждане и развитие на млад конкурентоспособен научен потенциал в областта на физиологията, фитохимията, геномиката, протеомиката и биоразнообразието на еукариотните организми



Договор BG051PO001-3.3.06-0025

Издавам специални благодарности към проекти към ФНИ, E01/0001 и ДМУ-03/60.

Благодаря на родителите си за грижите и подкрепата през изминалите години.

Благодаря на моите приятели, че през изминалите години стояха до мен.

ВЪЗПРИЕТИ СЪКРАЩЕНИЯ:

АСВ – абсолютно сухо вещество

ГХ/МС – газова хроматография-масспектрометрия

ТСХ – тънкослойна хроматография

EDTA – етилендиаминтетраоцетна киселина

RT – време на задържане

Обичайно използвани съкращения при мастните киселини:

$N:M^x$, където: N – брой въглеродни атоми, M – брой двойни връзки, x – място на двойната връзка

Обичайно използвани съкращения при стероли:

$C_n\Delta^{k,m}$, където: C_n – брой въглеродни атоми, $\Delta^{k,m}$ – места на двойните връзки

СЪДЪРЖАНИЕ

ВЪВЕДЕНИЕ	5
ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	7
МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ	8
1. Произход на водораслото <i>Trachydiscus minutus</i> , отглеждане и измерване на абсолютно сухо вещество	8
2. Използвани физикохимични методи и уреди	8
РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ.....	10
1. Разработване на нова хранителна среда	10
2. Отделяне на биомасата от културалната течност	17
3. Извънклетъчни отделения на водораслото	20
4. Въвеждане на <i>Trachydiscus minutus</i> в пречистването на биогаз	26
5. Предотвратяване на замърсяването от други водораслови видове	31
6. Влияние на хербициди върху растежа и състава на водораслото <i>Trachydiscus minutus</i>	34
7. Биологично преобразуване на вещества, добавени в средата....	37
8. Водораслото <i>Trachydiscus minutus</i> като част от хранителна верига фитопланктон-риба	39
ИЗВОДИ	41
ПРИНОСИ	43
УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ	44
СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ ВЪВ ВРЪЗКА С ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА И ЗАБЕЛЯЗАНИ ЦИТАТИ ПО ТЯХ	45

1. ВЪВЕДЕНИЕ

Едноклетъчните водорасли, независимо от простото си устройство, разпалват въображението на учените от години благодарение на своята способност да синтезират полезни вещества. Вече повече от шест десетилетия има активен интерес към тяхното масово отглеждане, макар интересът периодично да се засилва и да стихва. Първоначалният бум, благодарение на който масовото отглеждане на водорасли добива обществена популярност, е свързан с развитието на космическите технологии и по-конкретно с идеята кислородът, който е нужен за живота на космонавтите в неблагоприятни условия, да се получава от водорасли. През последните няколко години сме свидетели и на втори бум покрай популяризирането на идеята за микроводораслите като основа на производството на биогоривата през 21^{-ви} век.

Независимо от факта, че в световен мащаб са установени хиляди водораслови вида, едва няколко са тези, които се използват във водорасловото производство. И въпреки това не можем да отречем, че натрупаният опит с тези няколко вида водорасли е богат. Основите на отглеждането на водорасли са отдавна положени. Днес се знае, че те могат да се култивират успешно в открити площи, в покрити басейни и във фотобиореактори. През годините са установени условията, които са необходими на водораслите да растат непрекъснато, както и отделните биохимични характеристики на основните

водораслови класове. Благодарение на литературната справка можем да заключим, че „ние стоим на раменете на гиганти”. Дошло е времето натрупаният опит да се разпростре и да се приложи както спрямо водорасли, които са били пренебрегвани през годините, така и спрямо новоизолирани водораслови щамове, които тепърва подлежат на изучаване.

Засилва се интересът към водораслите, които могат да синтезират полезни за хората вещества, но които не се синтезират от висшите растения, с които се изхранваме. Безспорно е, че е необходимо да се търсят начини за внедряване на такива водорасли в производството. Така например жълтозелените водорасли имат по-различен метаболизъм от този на културните растения и някои от тях синтезират омега-3 мастни киселини, като ейкозапентаенова киселина. Такова водорасло е и *Trachydiscus minutus*, което е обект на изследване в настоящия дисертационен труд.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел на дисертационния труд е оптимизиране на условията за отглеждане на водораслото *Trachydiscus minutus*, допълване на знанието за физиологичните и биохимичните му характеристики и търсене на приложения в биотехнологичната практика.

За постигане на целта бяха поставени за изпълнение следните **задачи**:

1. Съставяне на нова хранителна среда за водораслото с оглед повишаване на неговия прираст.
2. Качествено и количествено определяне на извънклетъчните отделяния на водораслото.
3. Търсене на възможности за използване на водораслото в биогоривната промишленост.
4. Изпитване на влиянието на подбрани вещества (хербициди, стероли) върху растежа и качествата на биомасата на водораслото.
5. Оценка на биотехнологичните качества на *Trachydiscus minutus* като основа за възникване на микропредприятие.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

1. Произход на водораслото *Trachydiscus minutus*, отглеждане и измерване на абсолютно сухо вещество.

Водораслото *Trachydiscus minutus* (Bourrelly) Ettl, щам Lukavský et Přebyl 2005/1, е получено от колекцията SCALA на Институт по ботаника към Чешка академия на науките, град Требон. В лабораторни условия водораслото е отглеждано като монокултура в съоръжения, описани от Дилов (1985). Температурата на отглеждане е 26 – 30 °C, осветлението е непрекъснато с интензивност 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, като са използвани луминесцентни лампи (5 x 40 W). Осигурява се непрекъснато разбъркване с 3 $\text{cm}^3\cdot\text{s}^{-1}$ въздух, обогатен с 0.5 % (v/v) CO₂.

За измерване на абсолютно сухо вещество (АСВ), водорасловата биомаса се центрофугира при 3000 rpm за нейното пълно отделяне от културалната течност. Прирастът се отчита тегловно след отделяне на средата, отстраняване на утаени соли с 10% CH₃COOH и сушене при 105 °C до постоянно тегло. Определянето се прави веднъж на всеки 24 часа с три измервания в три повторения.

2. Използвани физикохимични методи и уреди

Данни за аналитичната апаратура, използвана при работата, е представена на **Таблица 1**:

Таблица 1.

Метод	Уред	Място
Спектрофотометрия във видимата област	T70 UV/VIS Spectrometer, PG Instruments Ltd	ИФРГ-БАН
Газова хроматография	Perkin-Elmer 3920B	ИФРГ-БАН
Газова хроматография - масспектрометрия	GC Hewlett-Packard 6890, MS 5973: 30 m x 0.25 mm капилярна колона, 0.25 μ m HP5-MS, 70 eV	ИОХЦФ-БАН

При всички аналитичните изследвания е използвана изцяло стъклена апаратура, а при подготовката на проби за анализ с газова хроматография-масспектрометрия (ГХ/МС) са използвани двойно дестилирани разтворители, за да се намали възможността за попадането на фталати като замърсители.

Преди провеждането на ГХ, метилираните мастни киселини минават през препаративна тънкослойна хроматография (ТСХ) за премахване на евентуалните примеси.

Данните от биологични опити са представени като средни стойности от най-малко 3 повторения. Газовите хроматограми са в две повторения. Единичните опити са представени само като потвърждения и на тях не се основават физиологични заключения.

За количественото определяне на хлорофил А и каротеноидите е използван спектрофотометричен метод според McKinney (1941). Общото количество белтъци е определено по метода на Lowry (Lowry et al, 1951).

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Разработване на нова хранителна среда

1.1. Подбиране на подходящ азотен източник

При създаване на нова хранителна среда за водорасли се започва с азотния източник и концентрацията, в която той трябва да бъде приложен. Подборът зависи от наличието и активността или на ензима нитратредуктаза, или на ензима уреаза. Опитите ни показаха, че *Trachydiscus minutus* може да расте както на карбамид, така и на нитрат.

Широко използваната до момента среда на Zehnder (Staub, 1961), дори и в тройна концентрация, е с ниско съдържание на натриев нитрат.

Първоначалните опити показаха, че добавянето на азотен източник в излишък ($\text{NaNO}_3 = 5\,950 \text{ mg.dm}^{-3}$, $\text{NH}_2\text{CONH}_2 = 2100 \text{ mg.dm}^{-3}$) не само не ускорява растежа, но напротив – забавя го. По-подходящо би било, при отглеждането на *Trachydiscus minutus* в големи обеми, азотният източник да се внася на порции, за да не представлява стресов фактор. Опитът по създаването на нова хранителна среда продължи с избирането на междинна концентрация – между тази на Zehnder и използваната по-горе ненужно висока концентрация.

Окончателните концентрации, на които се спряхме, бяха: $\text{NaNO}_3 = 2\,000 \text{ mg.dm}^{-3}$, $\text{NH}_2\text{CONH}_2 = 1\,000 \text{ mg.dm}^{-3}$.

1.2. Създаване на нова хранителна среда

Беше създадена нова хранителна среда с изцяло нова пропорция на солите, както е описано в **Таблицы 2 и 3**, сравнено с пропорциите на другите хранителни среди. Новата среда бе съставена в два варианта, различаващи се само по азотния източник. В единия вариант това е натриев нитрат, а в другия – карбамид. Сравнявайки растежа на водорослото между двата варианта се установи, че най-добро нарастване се постига в средата с NaNO_3 (**Таблица 7**). Новата среда позволява растеж, който достига 10% по-висока плътност в сравнение с контролните култури, отгледани в среда на 3x Zehnder. На **Фиг. 1** са показани нагледно разликите в растежа между културите, отгледани в нова среда и между контролните култури.

Проведените експерименти показват, че добър растеж се постига само ако началната водораслова плътност на културите е по-голяма от 0.5 g.dm^{-3} , независимо от използваната среда. При по-ниска водораслова плътност лаг-фазата, т.е. началната фаза от култивацията, се удължава. Най-висока стойност на растеж е наблюдавана при използването на среда с натриев нитрат на шестия и седмия ден след началото на култивацията. С други думи казано, там наклонът на допирателната към растежната крива е най-стръмен, съответно с най-голям тангенс от ъгъла. Това съответства на водораслова плътност от 4 g.dm^{-3} . Следователно може да приемем, че плътност от 4 g.dm^{-3} е оптимална.

Таблица 2. Макроелементи на новата хранителна среда в сравнение с използвани досега среди (mg.dm^{-3})

Соли, осигуряващи макроелементи	Zehnder (Staub, 1961)	Bischoff & Bold (1963)	Zachleder & Šetlík (1982)	Нова среда
NaNO_3	467	250	-	2000*
KNO_3	-	-	4042	-
KH_2PO_4	-	175	340	-
K_2HPO_4	31	75	-	250
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	25	75	988	266
Na_2CO_3	21	-	-	-
NaHCO_3	-	-	-	100
NaCl	-	25	-	50
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	59	-	-	40
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	-	25 / $2\text{H}_2\text{O}$	10.96	-
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	-	-	-	20
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	-	50	-	-
Fe-EDTA	10	-	-	-
Fe/Na-EDTA	-	-	18	-
Na_2 -EDTA	-	49.8	-	-

*Във варианта с карбамид използваме 1000 mg.dm^{-3} карбамид вместо $2000 \text{ mg.dm}^{-3} \text{ NaNO}_3$.

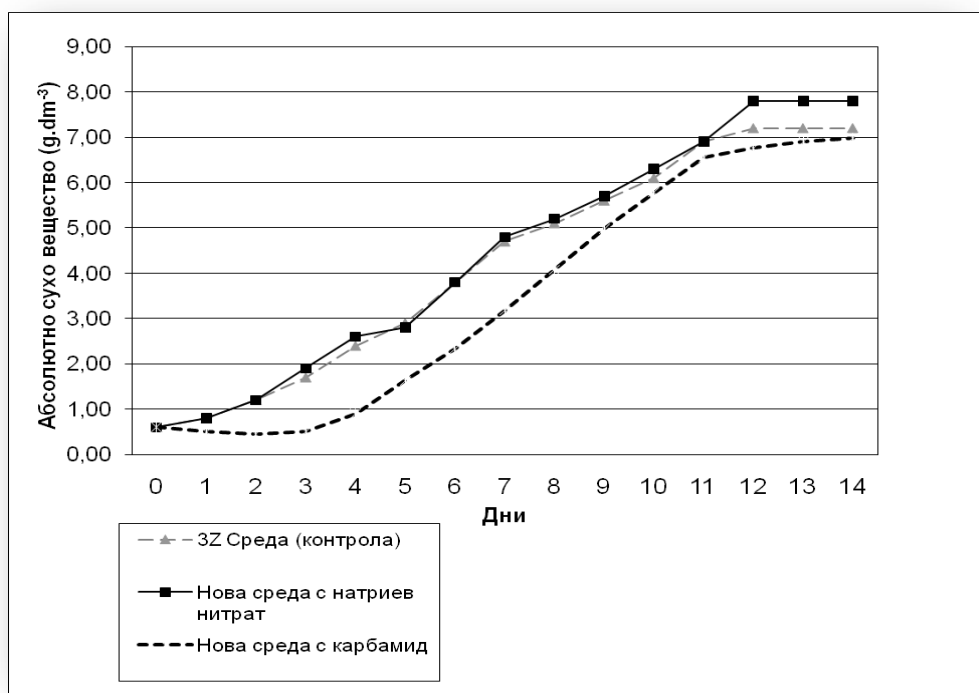
Растежът спира на 12-тия ден поради пълното изчерпване на солите. Средният дневен прираст при използването на нова хранителна среда с натриев нитрат е 0.6 g.dm^{-3} , докато при контролната култура прирастът за един ден е 0.55 g.dm^{-3} . Дневният прираст на варианта среда с карбамид е 0.45 g.dm^{-3} . Данните са показани подробно на **Таблица 4**.

Таблица 3. Микроелементи на новата хранителна среда в сравнение с използвани досега среди (mg.dm^{-3})

Соли, осигуряващи микроелементи	Zehnder (Staub, 1961)	Bischoff & Bold (1963)	Zachleder & Šetlík (1982)	Нова среда
H_3BO_3	6.18	0.114	3.09	2
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.87	0.882	1.43	2
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2.23		1.18	2
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	-	0.144	-	-
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2.49	0.157	1.24	0.4
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot$ $4\text{H}_2\text{O}$	1.96	-	0.88	0.04
MoO_3	-	0.071	-	-
$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.81	-	1.4	0.004
$\text{CoNO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	-	0.049	-	-

Култивирането на *T. minutus* в среда, съдържаща карбамид, макар и да е с по-слабо изразен растеж, е приемливо от практическа

гледна точка. Растежът се характеризира с по-дълга лаг-фаза и спира на 14-тия ден, два дни след спирането на растежа при култивирането в среда с натриев нитрат.



Фиг 1. Разлики в растежа между новата среда и контролата

Таблица 4. Сравнение на дневния добив между среда на Zehnder като контрола и новата среда във вариант с NaNO_3 и карбамид.

Ден	Контрола, среда 3 × Zehnder's		Нова среда с NaNO_3		Нова среда с карбамид	
	АСВ ^a	Дневен добив	АСВ ^b	Дневен добив	АСВ ^c	Дневен добив
0	0.6 ± 0.07	-	0.6 ± 0.05	-	0.61 ± 0.03	-
1	0.8 ± 0.2	0.2	0.8 ± 0.1	0.2	0.50 ± 0.06	-0.11
2	1.2 ± 0.2	0.4	1.2 ± 0.1	0.4	0.45 ± 0.01	-0.5

3	1.7 ± 0.3	0.5	1.9 ± 0.1	0.7	0.51 ± 0.01	0.06
4	2.4 ± 0.3	0.7	2.6 ± 0.1	0.7	0.90 ± 0.08	0.39
5	2.9 ± 0.2	0.5	2.8 ± 0.3	0.2	1.63 ± 0.05	0.33
6	3.8 ± 0.1	0.9	3.8 ± 0.1	1.0	2.33 ± 0.07	0.70
7	4.7 ± 0.0	0.9	4.8 ± 0.1	1.0	3.18 ± 0.04	0.85
8	5.1 ± 0.1	0.4	5.2 ± 0.1	0.4	4.08 ± 0.09	0.90
9	5.6 ± 0.1	0.5	5.7 ± 0.1	0.5	4.98 ± 0.09	0.90
10	6.1 ± 0.1	0.5	6.3 ± 0.1	0.6	5.78 ± 0.08	0.80
11	6.9 ± 0.1	0.8	6.9 ± 0.1	0.6	6.55 ± 0.05	0.77
12	7.2 ± 0.1	0.3	7.8 ± 0.0	0.9	6.76 ± 0.09	0.21

Средна стойност и стандартно отклонение от: a - б експеримента, b - б експеримента., c - 3 експеримента. АСВ е дадено в g.dm^{-3} . Дневният добив отчита натрупването на биомаса в рамките на 24 часа.

По време на опитите беше използван и съд с водораслова култура, съдържащ среда на Zachleder & Šetlík. Тази култура бе използвана като паралелна контрола. Беше установено, че максималното натрупано количество биомаса съответства на $7.0 \pm 0.2 \text{ g.dm}^{-3}$, сходно с максималното количество биомаса, получено при използването на средата на Zehnder. Резултатите противоречат на твърдения, според които водораслото може да натрупа биомаса от 13 g.dm^{-3} (Řezanka et al, 2012) при използване на среда на Zachleder & Šetlík и дори да достигне биомаса от 16 g.dm^{-3} (Lukavský, 2012). Тази среда използва за азотен източник

калиев нитрат в концентрация 4 g.dm^{-3} , което съответства на 1.2 g чист азот. Дори само математически е невъзможно такава среда да осигури всички необходим азот за достигането на биомаса от 16 g.dm^{-3} .

Независимо, че новата хранителна среда осигурява възможност за натрупване на 10% повече биомаса в сравнение с тази на Zehnder, по-добрият баланс на соли при нея не повишава скоростта на растеж. *T. minutus* остава бавнорастящо водорасло и това свойство му е присъщо.

Три причини има за по-бавния растеж на това водорасло:

1. То използва алкален йон като азотен източник. Нитратът първо трябва да се редуцира до нитрит чрез ензима нитратредуктаза и след това нитритът се редуцира до амониев йон чрез ензима нитритредуктаза. Водораслите, които предпочитат амониев йон, могат веднага да го включат в метаболизма си, като го внедрят в аминокиселините.
2. Водораслото натрупва липиди под формата на мастни капки. Синтезът на липиди изисква енергия.
3. Оптималната му температура е по-ниска в сравнение с тази на други водорасли, които растат по-бързо.

При отглеждане на *T. minutus* с карбамид, макар и да не се постига оптимален растеж, средата има други предимства. Карбамидът, за разлика от алкалните нитрати, има три пъти повече азот и се метаболизира напълно. След отделянето на

биомасата, културалната течност би могла да се използва за напояване на културни растения без ограничения.

Досега използваните среди на Zehnder, както и Bischoff и Bold (1963) съдържат недостатъчно количество магнезий. Магнезият е част от молекулата на хлорофила. Съдържанието на хлорофил А, което измерваме спектрофотометрично, е ниско при култивиране със среда на Zehnder – 1.3% (от сухото тегло). Новата среда осигурява достатъчно магнезий на водораслото. Съдържанието на хлорофил А при използването на новата среда във вариант с натриев нитрат беше измерено на 2.5%, а съдържанието на хлорофил А при използването на среда във вариант с карбамид възлизаше на 3.5%. Разликата дори може да бъде забелязана с невъоръжено око – културите, които растат на среда на Zehnder имат жълтеникав оттенък, докато културите, които растат на новата среда, изглеждат зелени.

2. Отделяне на биомасата от културалната течност

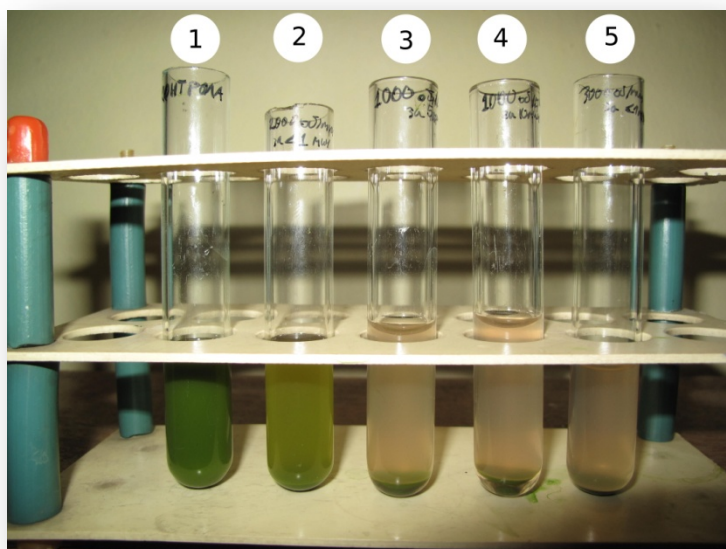
Беше направен опит, при който водораслова биомаса е центрофугирана при различни обороти. Пълно разделяне на водорасловата биомаса може да бъде постигнато при 1000 rpm (**Фиг. 2**). С използването на предишни хранителни среди при центрофугиране се забелязваше ясно видим бактериален слой с оранжев цвят (**Фиг. 3**), който при центрофугиране на високи обороти се натрупваше над центрофугираната водораслова биомаса. Той беше отделен и измерен тегловно, като възлизаше на $0.36 \pm 0.04 \text{ g.dm}^{-3}$ при водораслова плътност от 8 g.dm^{-3} .

Резултатът от центрофугирането при различни обороти е представен на **Таблица 5**.

При работа с новите хранителни среди такъв бактериален слой почти отсъстваше, или изобщо не се наблюдаваше. Освен това за водораслото *T. minutus* беше доказано и друго предимство – неговите клетки не се прилепваха към култивационните съдове, което означава, че почистването им е лесно.

Таблица 5. Резултати от центрофугирането на водораслото *T. minutus*

Обороти, min^{-1}	x g -	Време, min	Резултат
1000	156	5	Утаяване на около 95% от масата на водораслите
1000	156	10	Утаяване на около 99% от масата на водораслите
2000	625	<1	Пълно утаяване на водораслите и пренебрежимо утаяване на бактериите
3000	1408	<1	Пълно утаяване на водораслите и утаяване на около 50% от масата на бактериите
4000	2505	10	Пълно утаяване на водораслите и утаяване на 95% от масата на бактериите
5000	3915	10	Пълно утаяване на всички клетки



Фиг. 2. Центрофугиране на водораслото *T. minutus* при различни обороти: 1. Контрола (без центрофугиране), 2. Центрофугиране при 1000 rpm < 1 минута, 2. Центрофугиране при 1000 rpm за 5 минути, 3. Центрофугиране при 1000 rpm за 10 минути, 4. Центрофугиране при 3000 rpm за < 1 минута.



Фиг. 3. При използването на хранителна среда на Zehnder (вдясно) се вижда ясно обособен бактериален слой с оранжев цвят, както не се установява при използване на новите хранителни среди (вляво – с натриев нитрат, в средата – с карбамид)

Резултатите показват, че за разлика от много други водорасли, *T. minutus* е подходящ за отглеждане в малка семейна фирма. За условията на малка държава като България, с по-бедна икономика, такива фирми трудно биха могли да се сдобият със скъпи промишлени центрофуги, каквито обичайно са необходими за водорасловото производство. Освен това, като правило разходите, необходими за поддръжката на такава центрофуга могат да достигнат до 25 % от всички разходи, необходими за получаването на водораслова биомаса (Zenouzi et al, 2013). Ако водорасли, които трудно се поддават на отделяне от течността (например *Porphyridium*, *Rhodella*, *Nannochloropsis*) биха били по-подходящи за отглеждане в цехове към малки или средни предприятия, тъй като разполагат с по-голям капитал, то водораслото *Trachydiscus minutus* е подходящо за семейна фирма, или микро-предприятие – т.е. предприятие със средносписъчен брой на персонала по-малък от 10 души и годишен оборот, който не превишава 3 900 000 лева. (Закона за малките и средните предприятия на РБ, ДВ, бр. 84 от 24.09.1999 г. , Чл. 3. (изм. и доп. ДВ, бр. 64 от 2004 г., изм., бр. 59 от 2006 г.)).

3. Извънклетъчни отделяния на водораслото

В рамките на дисертационния труд за първи път беше извършен качествен и количествен анализ на извънклетъчните вещества на *Trachydiscus minutus*. Тегловно установеното количество мастноразтворими или още липофилни

извънклетъчни вещества е приблизително 1.5 mg.dm^{-3} . Техният състав е представен на **Таблица 6**. Тегловно установената концентрация на водоразтворимите или хидрофилни извънклетъчни вещества е по-висока и достига до 1 g.dm^{-3} , но както се вижда от **Таблица 7** полимерни продукти липсваха или ако ги има, са в нищожно количество.

В лабораторната ни практика сме ограничавали попадането на фталати в пробите чрез старателно измиване на стъкларията, а органичните разтворители, макар и обозначени като „чисти за анализ“, биват дестилирани преди работа. Не сме използвали пластмасови съдове и пособия при опитите. Независимо от това фталати продължават да бъдат откривани, както е видно на **Таблица 6**. Възможно ли е фталатите да не са замърсител, а напротив - да се синтезират от водорасли? Според Babu and Wu (2010) водораслите наистина са в състояние да синтезират фталати. Все пак не ни е известно съществуването на такъв биосинтетичен път. Засега не сме в състояние да посочим грешка в методиката, която авторите използват за тяхното определяне. Въпросът за фталатите остава открит, а както отричането на естествен биосинтетичен път, така и потвърждаването му, са еднакво важни и си заслужават усилията.

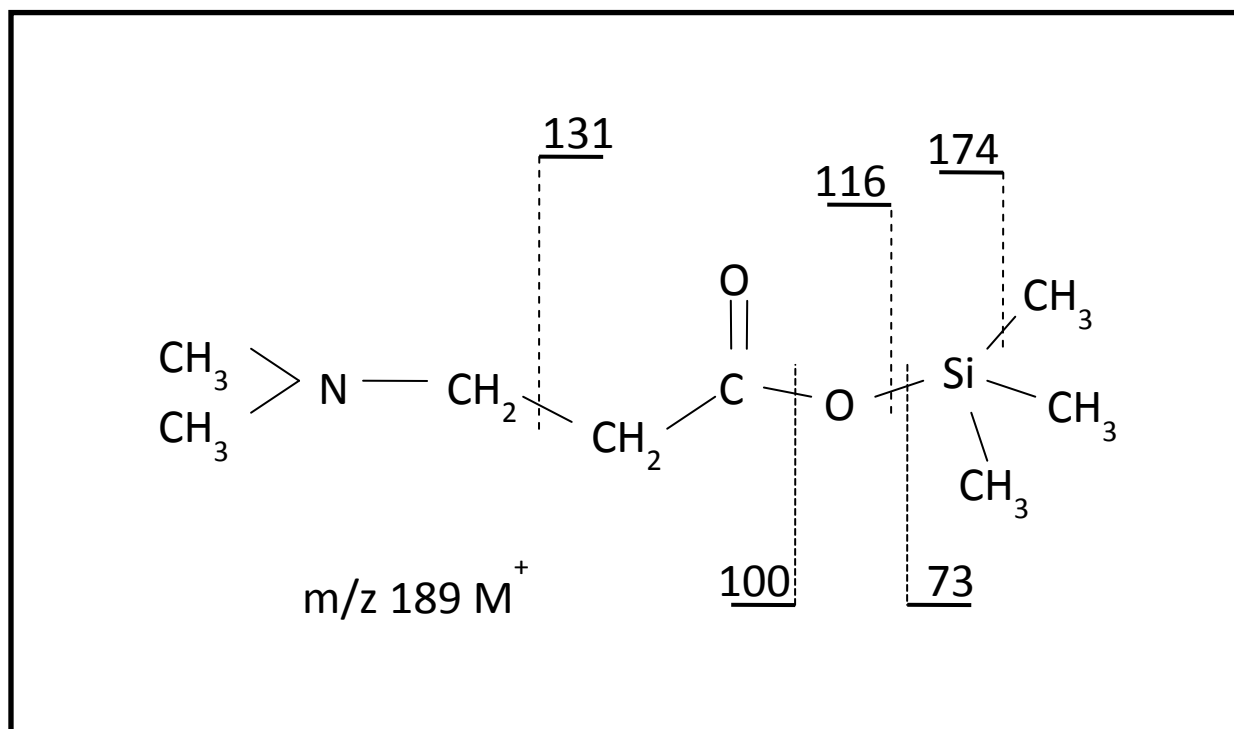
Таблица 6. Съотношение на извънклетъчни мастноразтворими вещества в % (m.m)

Вещество	%	RT	m/z
Дибутилфталат	57.9	35.398	m/z 278 [M ⁺], (1 %); m/z 149 (100 %)
Дихексилфталат	10.3	40.777	m/z 334 [M ⁺], (1 %); m/z 149 (100 %)
Вероятен фталат	7.6	45.372	m/z 279, (21 %); m/z 207, (3 %); m/z 167 (37 %); m/z 149 (100 %)
Дихидроситостерол	5.3	54.953	m/z 414 [M ⁺], (3 %); m/z 386 (100 %); 368 (40 %); m/z 353, (39%); m/z 301, (50%)
Общо въглеродороди и мастни киселини	18.9	--	--

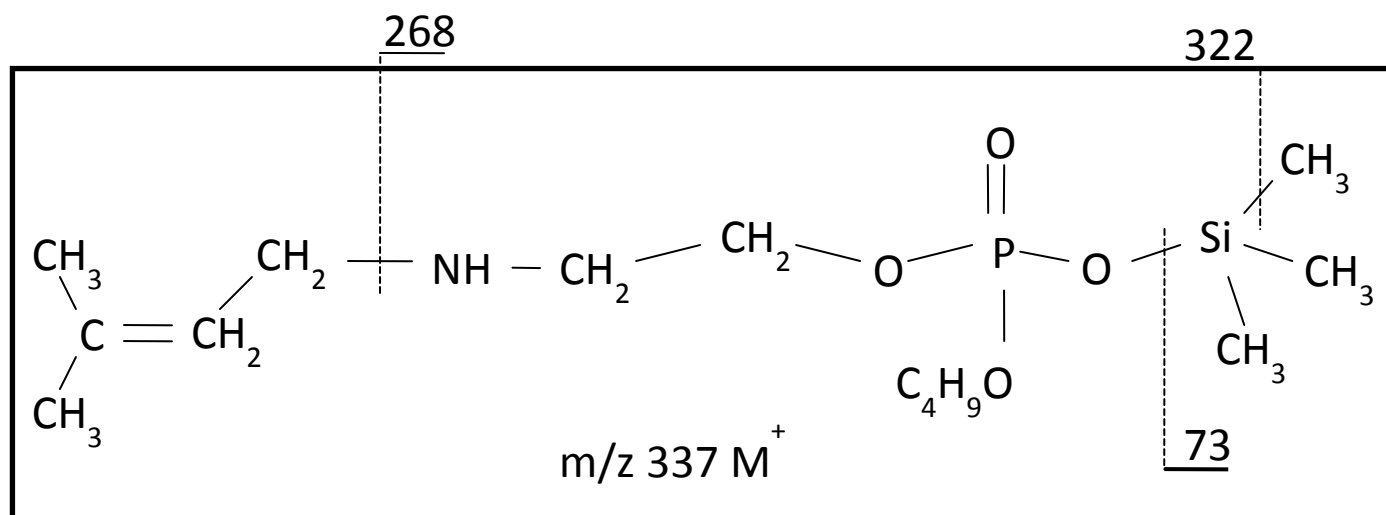
Таблица 7. Съотношение на извънклетъчни водоразтворими вещества в % (m/m) като $(\text{CH}_3)_3\text{Si}$ -производни

Вещество	% (m/m)	RT, min	Фрагментни йони (m/z), интензивност (%)
3-Диметиламинопропионова киселина	2.9	3.900	m/z 189 [M^+], (2 %); m/z 174 (18 %); 147 m/z (100 %); m/z 131, (8 %); m/z 116 (1 %); m/z 100 (10 %); m/z 89 (1 %); m/z 73 (18 %)
Гликолат	2.4	5.888	m/z 220 [M^+], (1 %); m/z 147 (100 %); m/z 131 (8 %); m/z 117 (3 %); m/z 73 (19 %)
Деценова киселина	6.8	7.671	m/z 227 [$\text{M} - \text{CH}_3$] ⁺ , (29 %); m/z 147 (100 %); m/z 73 (19%)
N-Изопентенилхолин-(бутил)-фосфат	30.2	9.278	m/z 337 [M^+], (1 %); m/z 322 [$\text{M} - \text{CH}_3$] ⁺ (98 %); m/z 268 [$\text{M} - 69$] ⁺ (15 %); m/z 147 (13 %); m/z 73 (100 %)
Окситетрадеканова киселина (оксимиристинова)	44.8	10.623	m/z 314 (M^+), (1 %); m/z 299 ($\text{M} - \text{CH}_3$) ⁺ (5 %); m/z 155 (100 %); m/z 131 (5 %)
Други, общо	12.9	-	---

Между извънклетъчните вещества в средата на *T. minutus* открихме наличието на 3-диметиламинопропионова киселина (Фиг. 4).



Фиг. 4. Масспектрална фрагментация на 3-(диметиламино)-пропионова киселина под формата на триметилсилилов естер



Фиг. 5. Масспектрална фрагментация на N-Изопентенилхолин-(бутил)-фосфат под формата на триметилсилилов естер

За първи път установяваме наличие на диметиламинопропионова киселина във водорасли и в частност в *T. minutus*. Други N-диметилови производни на аминокиселини са намирани в *Scenedesmus sp.* (Kambourova et al, 2006; Petkov et al, 2010).

Откриваме също така N-изопентенилхолин-(бутил)-фосфат от групата на фосфохолините, който е представен в твърде значителна концентрация - около 30 % от общите водоразтворими извънклетъчни вещества (Фиг. 5). N-изопентенилхолин-(бутил)-фосфатът е вещество от групата, която доби известност като алкилфосфохолини (Dummer et al, 1992; Nilgard et al, 1993). Веществото е ново не само за *T. minutus*, но и за водораслите изобщо. Продължава усилено да се работи върху нови алкилфосфохолини във връзка с лечението на ракови заболявания (Kuo et al, 2014). В този смисъл N-изопентенилхолин-(бутил)-фосфатът, който за първи път установихме в извънклетъчните отделения на *T. minutus* заслужава продължаването на изследванията.

За пълна увереност в структурата е потребно изолиране на веществото в чист вид и подлагане на допълнителни анализи. Структурата е предполагаема, докато не бъде окончателно доказана. Самото бутилиране на една от хидроксилните групи на фосфорната киселина може да бъде извършено във водната среда под действие на бактериални ензими, както е наблюдавано (Пунева и Тончева-Панова, 1981).

Между извънклетъчните вещества имаше и свободни мастни киселини под формата на натриеви соли. В общия случай, наличието на извънклетъчни мастни киселини може да има неблагоприятен ефект при отглеждането на водорасли в големи мащаби поради разпенването на течността (Kambourova et al, 2004). Поради сравнително малкото количество на извънклетъчни вещества като цяло можем да предположим, че при *T. minutus* този ефект ще е незначителен, още повече, че при лабораторните опити не бе наблюдавано разпенване.

4. Въвеждане на *Trachydiscus minutus* в пречистването на биогаз

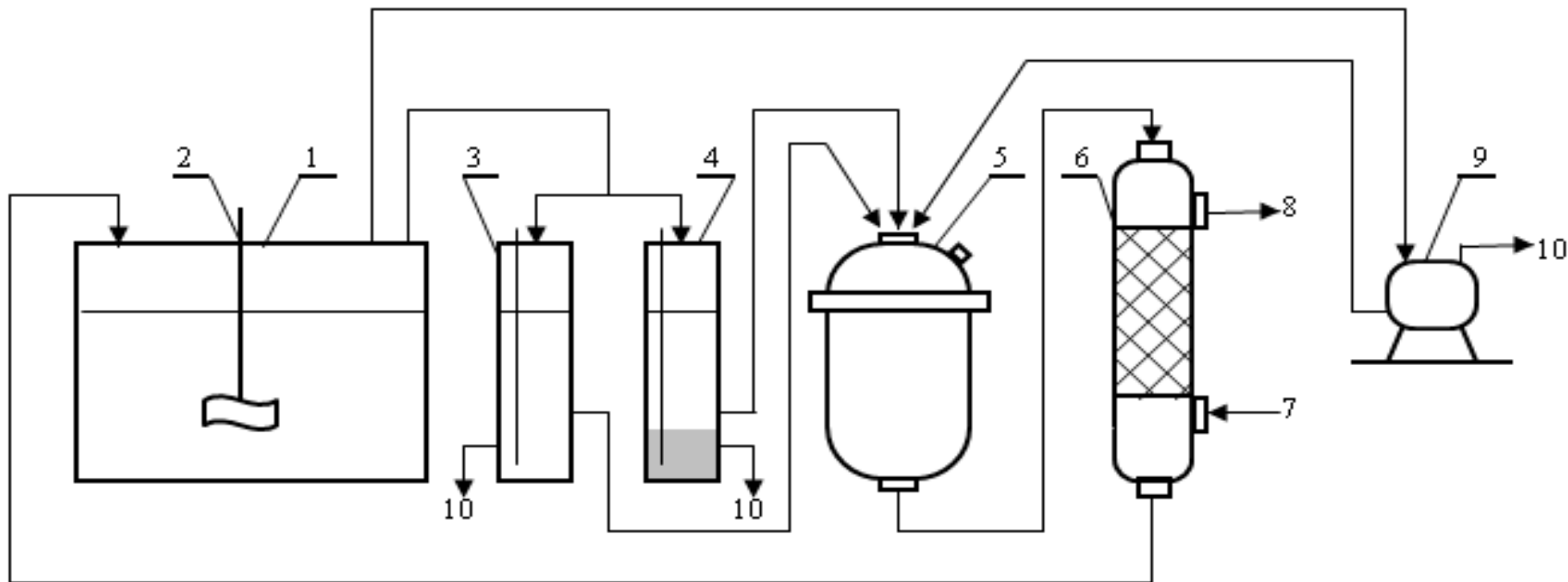
Обстойният преглед на литературата и на съществуващата биотехнологична практика показва, че във всичките си разновидности биогоривата от водорасли винаги се основават на превръщане на биомаса в гориво. Независимо от факта, че водорасловата биомаса представлява скъп продукт, съществуват нереалистични предположения, че получените биогорива от преработката на тази биомаса ще са евтини. Затова при пристъпването към тази работа бе сменен подходът: водораслите биха могли да се използват при производството на биогорива, но не чрез преработка на висококачествената биомаса, а чрез впрягането на фотосинтетичната им функция.

Идеята за пречистването на въглеродния диоксид от биогаз чрез водорасли не е нова (Koh et al, 1988; Converti et al, 2009). За съжаление обаче директното прекарване на биогаз през

водораслова култура води до получаване на опасна смес от метан и 10-24% кислород. Тази смес е експлозивна и не може да се сгъстява и пренася. Нашата цел е да се получи богат на метан биогаз, който да може да се сгъстява и е годен за транспорт. На **Фиг. 6** е предложена концептуална схема.

Водорасловата култура се отглежда в биореактор без постоянно подаване на въглероден диоксид, а само с механично разбъркване и повишено съдържание на натриев хидрогенкарбонат. Част от водорасловата суспензия се прехвърля в два или повече по-малки култивационни съда с обем 5-10% от този на биореактора. Докато биомасата е в по-малките култивационни съдове, част от нея се утаява и пада на дъното. При използването на водораслото *T. minutus* голяма част от биомасата би паднала с течение на времето, но все пак се налага центрофугиране при ниски обороти, както е описано в предната глава.

Течната фаза от първия култивационен съд се подлага на вакуум за премахване на разтворените газове. Събраната биомаса може да бъде върната обратно в култивационния съд, ако е в малко количество, или да се отдели като продукт. Същата процедура се прилага и за втория култивационен съд, за да може да се събере културална течност за по-нататъшните етапи от процеса.



Фиг. 6. Пречистване на биогаз и получаване на биомаса от водорасли.

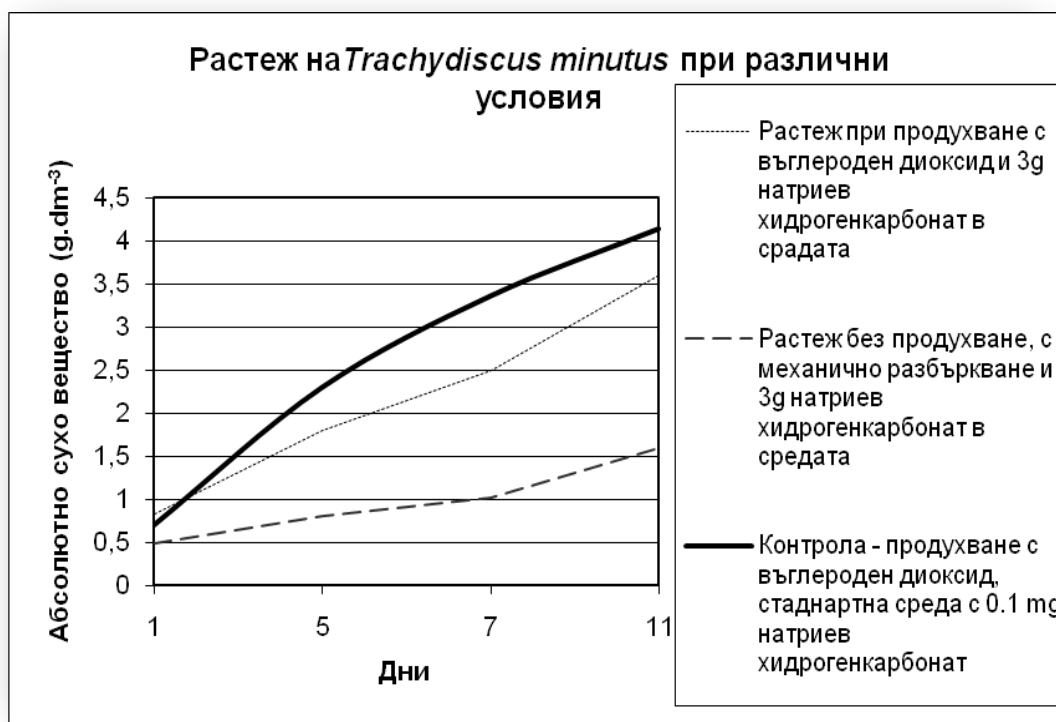
1. Фотобиореактор; 2. Механична бъркалка; 3, 4. Култивационни съдове I и II; 5. Вакуум колона; 6. Абсорбционна колона; 7. Вход на биогаз; 8. Изход на пречистен метан; 9. Центрофуга; 10. Водораслова биомаса

Вакуумирането на културалната течност за 3-4 минути е достатъчно за изгонването на кислорода. В лаборатория беше проведен опит с подлагане на културалната течност под вакуум. Мехурчетата разтворен газ, който се отделя от течността са видими с просто око до около третата минута. В промишлени условия вакуумирането на течността се прави сравнително лесно в подходящ стоманен съд и наблюдателно стъкло. Следващата стъпка след вакуумирането е прекарването на културалната течност през абсорбционна колона за насищане с CO_2 от биогаз.

Разтворимостта на въглероден диоксид във вода е около 60 пъти по-голяма в сравнение с тази на метан. Освен това за да се възстанови NaHCO_3 от Na_2CO_3 е необходимо 0.78 g.dm^{-3} въглероден диоксид за конкретния случай. Истинският капацитет на разтвора да абсорбира CO_2 е над 2 g.dm^{-3} , докато разтворимостта на метан е едва 0.023 g.dm^{-3} . Оттук следва, че загубите на метан са нищожни, но също така могат да бъдат точно предвидени.

Свидетелство за възстановяването на натриев хидрогенкарбонат до първоначалните концентрации е понижаването на рН. Крайният продукт е получаването на чист метан с нищожна концентрация на въглероден диоксид и без кислород. По този начин пречистеният метан подлежи на безопасно съгъстяване с компресор и той може да бъде пренасян също така безопасно. Течността с възстановена концентрация на

NaHCO₃ се добавя обратно във фотобиореактора с механично разбъркване.



Фиг. 7. Растеж на *Trachydiscus minutus* при различни условия

Беше проведен експеримент без продухване, само с механично разбъркване и концентрация на NaHCO₃ от 3 g.dm⁻³ (Фиг. 7). Кратък достъп до въглероден диоксид беше осигуряван веднъж на всеки два дни, 5 минути подаване на чист въглероден диоксид, за да се възстанови първоначалното количество на NaHCO₃. Резултатите показаха, че водораслото *Trachydiscus minutus* може да расте при такива условия. Сухата водораслова биомаса нарастна от 0.5 g.dm⁻³ до 0.8 g.dm⁻³ на 5-тия ден от началото на култивацията, на 7-мия ден тя нарастна на 1 g.dm⁻³, а на 11-тият беше 1.6 g.dm⁻³. При лабораторния експеримент ние

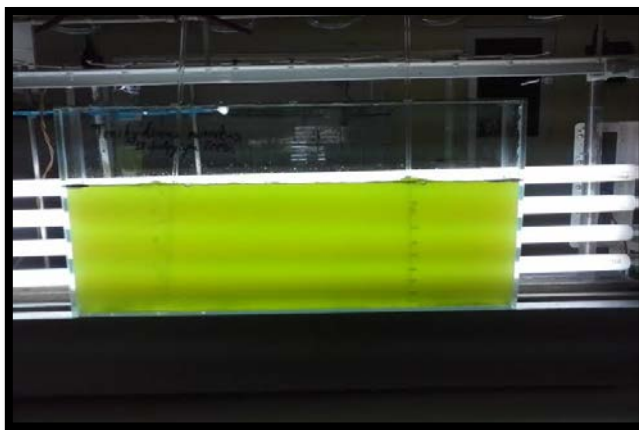
прилагахме начална плътност от 0.5 g.dm^{-3} , което е обичайна лабораторна практика при интензивно отглеждане на водорасли. Ниската плътност обуславя достъп на светлина до всяка водораслова клетка. При култивация в промишлени мащаби и много по-интензивна слънчева светлина ще се предпочита плътността в началните етапи да е по-висока, над $1-2 \text{ g.dm}^{-3}$. По-високата водораслова плътност ще обуславя и по-висока интензивност на процеса на пречистване на биогаза до метан.

5. Предотвратяване на замърсяването от други водораслови видове

Замърсяването от други водораслови видове може да се превърне в сериозна пречка пред отглеждането на *Trachydiscus minutus*. Като правило, водорасли с нисък температурен оптимум растат по-бавно и по-лесно се замърсяват. Лабораторният опит показва, че много често настъпва замърсяване със *Scenedesmus*, но реакцията на *T. minutus* в такава смесена култура може да бъде различна в зависимост от температурата и хранителната среда. При отглеждане в среда с NaHCO_3 и при непрекъснато продухване, *Scenedesmus* се развива изключително бързо и в рамките на два-три дни напълно измества *T. minutus* (микроскопски се наблюдават само клетки на *Scenedesmus*). При работа с новата хранителна среда при голяма плътност (над 5 g.dm^{-3}) и малко замърсяване със *Scenedesmus* – под 5%, смесената култура може да остане продължително време в това

съотношение в устойчиво състояние в продължение на дни, без *Scenedesmus* да измества *T. minutus*. При по-ниски плътности на културата *Scenedesmus* надхвърля 50-60%.

За да проверим поведението на водорасловата култура в големи обеми, беше заложен опит за отглеждането на *T. minutus* в съдове с вместимост 8 dm^{-3} , с дебелина на водорасловия слой 60 mm (Фиг 8.)



Фиг. 8. Отглеждане на *T. minutus* в 8 dm^{-3} съд с непрекъснато подаване на CO_2

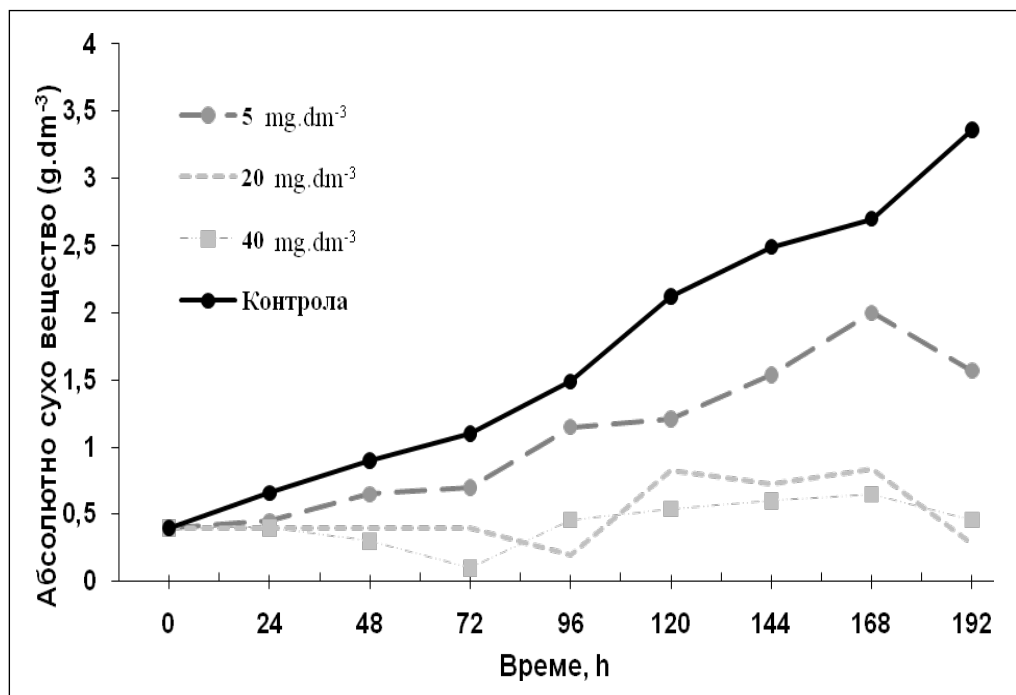
При този опит *T. minutus* беше отглеждан в продължение на 7 дни без да настъпи замърсяване, като биомасата нарасна от начална плътност 0.24 до 0.74 g.dm^{-3} . Въпреки че практиката показва, че културите от *T. minutus* по-трудно влизат в състояние на експоненциален растеж при начална плътност по-малка от 0.5 g.dm^{-3} , ниската начална плътност бе подбрана целенасочено, за да се провери цялостното поведение на културата в голям съд. Освен това, при отглеждане в по-големи вани, при по-голяма

плътност става по-трудно да се отчете точната стойност на абсолютно сухото вещество, поради спонтанното утаяване на *T. minutus*, което вече е упоменато в глава 2. Опитът потвърждава твърдението ни, че при отглеждане в големи обеми трябва да се прилага подходящо разбъркване.

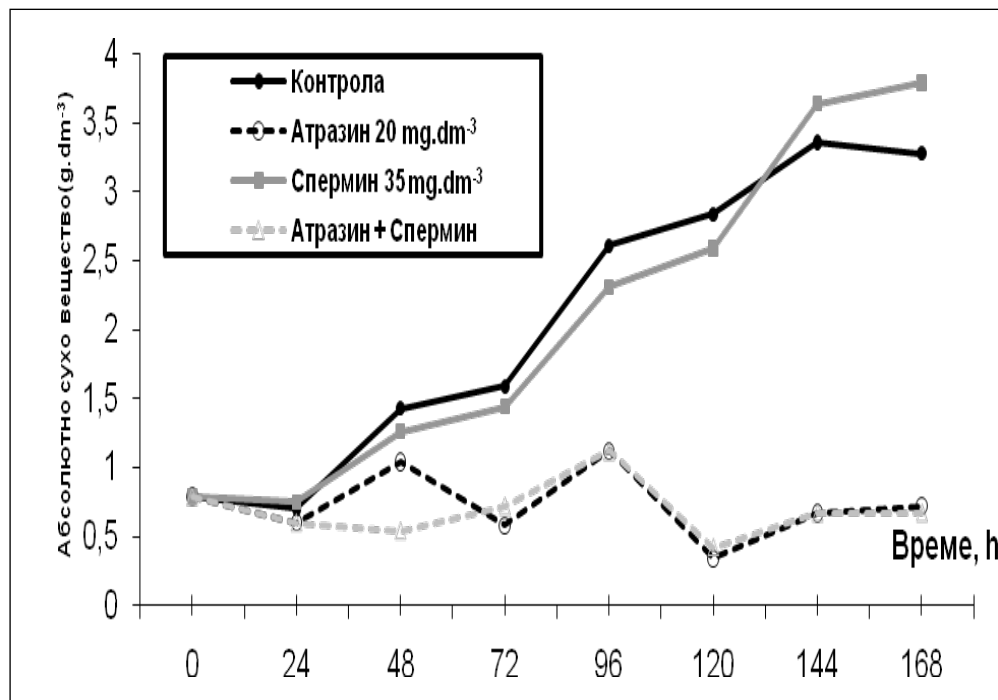
Съществува възможност за отглеждането на *T. minutus* в плътно затворен биореактор, със среда с добавен 3 g.dm^{-3} NaHCO_3 при ограничено барбутиране с чист въглероден диоксид за 5 минути на 2 дни, според описаното в **раздел 4**. Водораслото натрупва биомаса около два пъти по-бавно, но независимо от това е в състояние да достигне плътност от 5 g.dm^{-3} . Целта на плътното затваряне и ограничено барбутиране е да се избегне замърсяване. Опитът, показан на **Фиг. 8**, започна да проявява признаци на замърсяване след осмия ден. Но паралелен опит с механично разбъркване, който се провеждаше в същото време, както и опита от **Фиг. 8**, показва, че замърсяване със *Scenedesmus* не настъпва. Това доказва, че произходът на замърсяването не е изначалната водораслова култура, която използваме за посев и която е една и съща и за двата опита. Опитите показват, че замърсяването идва от въздуха, който привнасяме при барбутиране с въглероден диоксид. Опитите да ограничим замърсяването на *T. minutus* с поставянето на филтри на изхода на въздухопотока не са успешни.

6. Влияние на хербициди върху растежа и състава на водораслото *Trachydiscus minutus*

В настоящия дисертационен труд бяха проведени опити с хербицидите глифосат (Фиг. 9) и атразин (Фиг. 10). Проучени бяха техните вредни въздействия, но също така се търсеше начин да бъдат преодоляни вредните въздействия на хербицида атразин чрез протектор.



Фиг. 9. Влияние на глифосат върху растежа на *T. minutus*



Фиг. 10. Влияние на атразин и протектор и смес от атразин и протектор в същите концентрации върху растежа на *T. minutus*

Контролните култури без хербицид растяха безпрепятствено в продължение на повече от 192 часа (**Фиг. 9**). Концентрация на глифосат от над 20 mg.dm^{-3} довеждаше до пълно потискане на растежа, докато концентрация на глифосат от 5 mg.dm^{-3} доведе само до частично потискане. Концентрация на атразин от 20 mg.dm^{-3} , също потискаше растежа (**Фиг. 10**). И двата хербицида оказваха слабо влияние върху процентното съдържание на мастни киселини, както и върху процентното съдържание на общи липиди и белтъци. Опитите за преодоляване на ефекта на атразин с протектор спермин беше неуспешно, за разлика от резултатите, получени при работа с висши растения, където е показано, че полиамините представляват добри протектори (Zheleva et al, 1994). Спермин и спермидин са често срещани

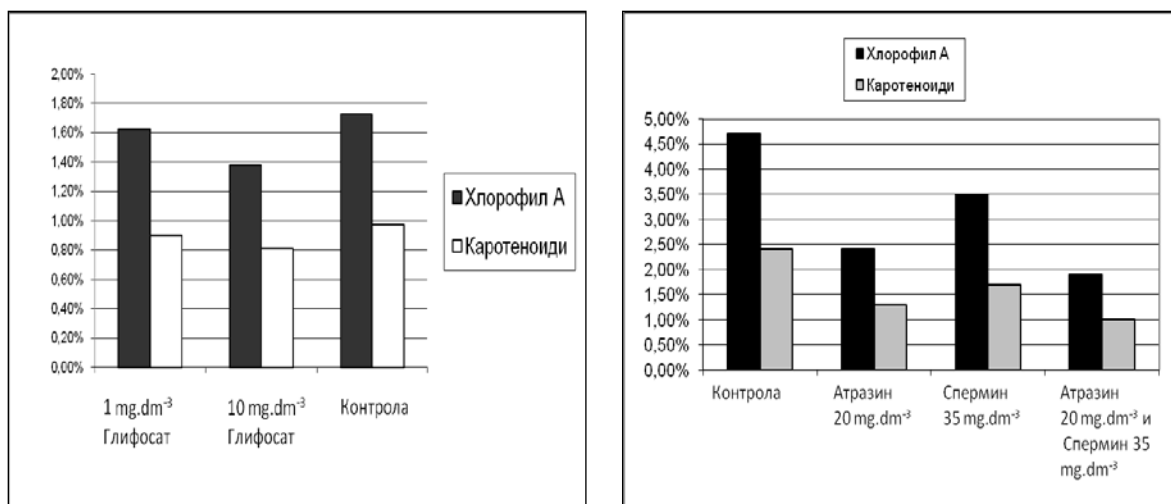
амини във водорасловите култури и те са следствие от бактериалния метаболизъм (Kneifel, 1979; Maiss et al., 1982). Водораслите, намирайки се в постоянно съприкосновение с разнообразни биогенни амини, е много вероятно да са изградили свое отношение към тях, по-различно от поведението на висшите растения към амини.

Самостоятелно приложен, сперминът изглежда да повишава процентното съдържание на ейкозанепнтаенова киселина (Таблица 8).

Таблица 8. Промени в съотношението на мастни киселини след 168-часово въздействие с атразин

М.к.	Контрола	Атразин, 20 mg.dm ⁻³	Спермин, 35 mg.dm ⁻³
12:0	2.3	tr.	1.5
14:0	48.4	32	16.4
16:0	5.7	13	4.0
16:1	4	2.1	5.2
18:0	1.7	0.2	1.5
18:1	0.1	0.3	0.2
18:2	1.4	6	4.5
α-18:3	0.1	3.6	0.2
20:4	1.5	0.7	3.5
20:5	35	42.7	63

Както атразинът, така и глифосатът повлияват неблагоприятно процентното съдържание на пигменти (Фиг. 11).



Фиг. 11. Процентно влияние на пигменти след 192 часОВО третиране с глифосат и 168 часОВО третиране с атразин.

7. Биологично преобразуване на вещества, добавени в средата

Независимо от факта, че за биологичното натрупване и преобразуване на вещества се предпочитат основно бактерии в сравнение с микроводорасли, ние решихме да проверим възможността *Trachydiscus minutus* да натрупва и преобразува холестерол. Беше проведен опит, при който една от две култури бе отглеждана в среда, обогатена с холестерол, а другата (контролната) беше в средата, описана в раздел 1.2.

Резултатите от проведения анализ с ГХ-МС за установяване на процентното съотношение на стероловите естери и на свободните стероли във водорасловите клетки, са представени на **Таблицы 9 и 10.**

Както се вижда на **Таблица 9** при добавяне на холестерол в средата, съществено се повишава количеството на свободните

стероли в клетките. От друга страна, процентното съотношение на останалите стероли намалява.

Таблица 9. Съотношение на свободните стероли (% m/m)

Свободни стероли	Контрола	Проба с добавен холестерол
Холестерол, $C_{27}\Delta^5$	53.9	86.4
24-Метилхолестерол, $C_{28}\Delta^5$	4.2	1.7
β -Ситостерол, $C_{29}\Delta^5$	38.8	10.5
Стигмаста-5,24(28)-диен-3-ол, $C_{29}\Delta^{5,24}$	3.1	1.3

Таблица 10. Съотношение на стероловите естери (% m/m)

Стеролови естери	Контрола	Проба с добавен холестерол
Естерно свързан холестерол, $C_{27}\Delta^5$	16.1	17.5
Естерно свързан $C_{28}\Delta^5$	6.9	6.9
Естерно свързан $C_{29}\Delta^5$	65.6	62.2
Естерно свързан $C_{29}\Delta^{5,24}$	11.4	13.3

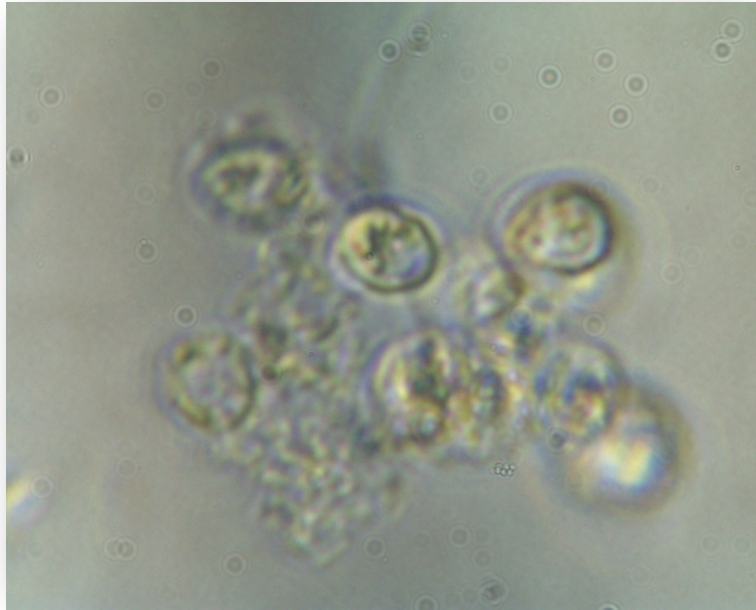
Резултатите показват, че холестеролът може да навлезе в клетките на водораслото *T. minutus*. Но както е видно от **Таблица 10**, повишаването на процента на естерно свързания

холестерол е незначително – т.е. в рамките е на стандартното отклонение. Макар че холестеролът навлиза в клетките, той не се включва в метаболитните процеси и остава като свободен стерол.

Опитът за преобразуване на стерол чрез използването на водораслото *T. minutus* не даде съществен резултат, за разлика от други водорасли и цианобактерии, където голямо количество от добавения стерол се подлага на естерификация в клетката (Петков, 1990) или в други случаи претърпява биологично окисление (Yokoama and Kuniyoshi 2004; Faramarzi et al, 2008).

8. Водораслото *Trachydiscus minutus* като част от хранителна верига фитопланктон-риба

Шест риби от вид *Poecilia reticulata* бяха изхранвани в продължение на два месеца само и единствено с изсушена водораслова биомаса от *T. minutus*. Всички шест броя риби се изхранваха успешно. Микроскопски снимки (Фиг. 12) на екскрементите от рибките показаха клетки на *T. minutus* с изпразнено съдържимо, което доказва, че водораслите се усвояват от организма. Не беше отбелязвана никаква смъртност в рамките на този период.



Фиг. 12. Снимка на екскремент от риба

Този опит доказва, че водораслото *T. minutus* не просто не проявява токсичност към организма на риба, но същевременно е напълно достатъчно за техния метаболизъм, като осигурява всички необходими хранителни вещества.

Разкрива се възможност за пряко приложение в рибовъдството, особено като се има предвид изключително подходящия състав на водораслото.

ИЗВОДИ

1. Водораслото *Trachydiscus minutus* се поддава на култивиране в лаборатория и при оптимални условия натрупаната биомаса може да достигне плътност $7-8 \text{ g.dm}^{-3}$. Водораслото може да бъде култивирано и в големи обеми. В случай че е необходимо да се избегне замърсяване с други водорасли, трябва да се прилага само механично разбъркване.
2. Установено е, че ежедневният добив на биомаса от около 1 g.dm^{-3} за денонощие е характерен за експоненциалната фаза, независимо от използваната среда. С промяната на пропорцията на солите може да се удължи само продължителността на експоненциалната фаза и това да доведе до цялостното увеличаване на добива.
3. Използването на биомаса от *Trachydiscus minutus* не е подходящо за получаването на биогорива поради бавния прираст, тъй като за достигането на плътност от 8 g.dm^{-3} са нужни около 12 дни. Това е крайно недостатъчно за нуждите на биогоривната промишленост, която изисква бързо натрупване на биомаса. Но фотосинтетичната функция на *Trachydiscus minutus* може да бъде използвана в биогоривната индустрия, като пречистване на биогаз от въглероден диоксид.

4. Хербицидите влияят върху растежа на водораслото *Trachydiscus minutus*, но слабо повлияват неговия състав, с изключение на каротеноидите.
5. Установено е, че *Trachydiscus minutus* може да натрупва холестерол в клетките си, но не го включва в метаболитните процеси.
6. Извънклетъчните мастноразтворими отделения са незначително малко - $1-2 \text{ mg.dm}^{-3}$ и не замърсяват средата. Извънклетъчните водоразтворими отделения достигат до 1 g.dm^{-3} . Във водоразтворимата фракция попада незначително количество мастни киселини под формата на натриеви соли.

ПРИНОСИ

1. Разработена е нова хранителна среда за водораслото *Trachydiscus minutus*, като постигнатият прираст в края на култивацията е с 10% по-висок в сравнение с досега използваните хранителни среди.
2. Установени са извънклетъчните метаболити, отделени от *Trachydiscus minutus*.
3. За първи път е установено наличие на N-Изопентенилхолин-(бутил)-фосфат (изопентенилфосфохолин) и диметиламинопропионова киселина във водорасли.
4. Разработен е ефективен метод за пречистване на биогаз до метан, годен за сгъстяване и превоз.

УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ

1. **Александров С, И Илиев, Г Петков, 2012.** Микроводораслите – ценна хранителна добавка. V-та национална научна конференция на българския фокален център на EFSA към Центъра за оценка на риска, БАБХ, 4 октомври 2012 г, София, България, Научни доклади по безопасност на храните, стр. 44-45.
2. **Alexandrov S, I Iliev, J Lukavský, G Petkov, 2012.** Influence of herbicides on the growth and composition of the yellow-green alga *Trachydiscus minutus*. In: Национална младежка конференция “Биологически науки за по-добро бъдеще”, 19-20 октомври 2012 г, стр. 76-77.
3. **Alexandrov S, I Iliev, G Gacheva, P Pilarski, G Petkov, 2013.** The alga *Trachydiscus minutus*: a healthy nutrition additive. Third National Conference with International Participation “Ecological Engineering and Environment Protection” (EEEP’2013), 13-14 June 2013.
4. **Alexandrov S, I Iliev, A Kroumov, G Petkov, 2014.** Algal Biofuels: A boon or bane? Scientific Conference – Plant Physiology and Genetics – Achievements and Challenges, 24-26 September 2014.
5. **Kroumov A, I Iliev, S Alexandrov, P Pilarski, G Petkov, 2013.** Analysis of SF/V ratio of photobioreactors linked with algal physiology. Third National Conference with International Participation “Ecological Engineering and Environment Protection” (EEEP’2013), 13-14 June 2013.

СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ ВЪВ ВРЪЗКА С ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА И ЗАБЕЛЯЗАНИ ЦИТАТИ ПО ТЯХ

1. **Alexandrov S**, I Iliev, J Lukavský, G Petkov, 2012. Influence of herbicides on the growth and composition of the yellow-green alga *Trachydiscus minutus*. J BioSci Biotech, SE/ONLINE: 123-126, ISSN: 1314-6246.

Цитат:

Pilátová J, 2013. The Potential Use of the *Eustigmatophyceae* in the production of biofuels. Thesis, Praha, Faculty of Science Charles University in Prague, Department of Botany.

2. **Alexandrov S**, I Iliev, G Petkov, 2013. The alga *Trachydiscus minutus* aids purification of biogas to methane. Genet Plant Physiol, 3(3-4): 126-132. ISSN: 1314-6394, e-ISSN: 1314-5770.
3. **Alexandrov S**, I. Iliev, G. Petkov, 2014. Establishment of Growth Conditions for Cultivation of the Microalga *Trachydiscus Minutus* at Laboratory Scale. Pure Appl Bio, 3(1): 01-09. ISSN: 2304-2478. ИФ: 0.365.

Цитат:

Řezanka T, J Lukavský, K Sigler, L Nedbalová, M Vítová, 2015. Temperature dependence of production of structured triacylglycerols in the alga *Trachydiscus minutus*. Phytochemistry, 110:37-45. ISSN: 0031-9422.