



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

ПЕТЯ ХРИСТОВА ДРАГАНОВА

**Потенциал на *Coelastrella* sp. BGV като обект за
производствено култивиране**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертация

за присъждане на образователна и научна степен “Доктор”

Научна специалност:

01.06.16 - Физиология на растенията

Научен консултант: Доц. д-р Пламен Пиларски

София, 2018

Дисертацията е написана на 104 печатни страници и е онагледена с 32 фигури и 12 таблици. Списъкът на цитираната литература включва 184 източника, от които 13 на кирилица и 171 на латиница.

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 № 279/ 27.04.2018г. в състав:

Вътрешни членове:

1. Доц. д-р Пламен Пиларски
2. Доц. д-р Калина Ананиева

Външни членове:

1. Проф. д-р Димитър Пеев
2. Проф. д-р Александър Ташев
3. Доц. д-р Ганка Чанева

Материалите по защитата са на разположение на интересувашите 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
ЛАБОРАТОРИЯ „ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА АЛГОЛОГИЯ“

ПЕТЯ ХРИСТОВА ДРАГАНОВА

**Потенциал на *Coelastrella* sp. BGV като обект за
производствено култивиране**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертация

за присъждане на образователна и научна степен “Доктор”

Научна специалност:

01.06.16 - Физиология на растенията

Научен консултант: Доц. д-р Пламен Пиларски

Рецензенти:

Проф. дбн Димитър Пеев

Доц. д-р Ганка Чанева

София, 2018

1. ВЪВЕДЕНИЕ

Интересът към микроводораслите датира от края на 19 век, след като Beyerinck (1890) е успял да получи чиста култура от *Chlorella vulgaris*. Въведените по-късно от Wartburg (1919) плътни култури от *Chlorella* стават традиционен обект за физиолого-биохимични изследвания. През 50-те години е доказана принципната възможност за култивиране на микроскопични водорасли от различни систематични групи. Отначало в производствени мащаби са култивирани видове от родовете зелени водорасли *Chlorella* Beijer. s.l. и *Scenedesmus* Meyen s.l., а по-късно и видове на синьозеленото водорасло от род *Arthrospira* Stizenberger ex Gomont. (Syn. *Spirulina* Turpin ex Gomont p.p.), на червеното водорасло от род *Porphyridium* (S.F.Gray) Nägeli и на зелените водорасли от род *Coelastrum* Nägeli, *Dunaliella* Teod. и др.

Микроводораслите са голяма и разнородна група главно фотоавтотрофни организми с повсеместно разпространение. В природните местообитания те често са подложени на действието на стресови фактори с абиогенен произход (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 и др.). Често тези фактори действат съвместно, което се означава като *комплексност* на действието, а някои от факторите взаимно се допълват, при което ефектът от тях се усилва и това се означава като *комплементарност* (Темнискова, Стойнева 2011). Изключителната физиолого-биохимична пластичност на водораслите лежи в основата на преживяването им при стресови условия, при попадане в среда с променящи се в широки граници физико-химични параметри и/или в силно конкурентна среда и т.н. Тези микроскопични организми са развили различни механизми за приспособяване, широко познати като *адаптации*. Сред тях са: 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, синтез на вещества с цитотоксично, антиоксидантно, антибиотично, алелохимично действие, сред които разнообразни вторични метаболити (изопреноиди, токсини) и др.

Днес те са не само обект, удобен за решаване на редица теоретични проблеми, но и продуценти на ценна биомаса, суровина за фармацевтичната, козметичната и хранителната промишленост като източници на различни продукти от типа на

пигментите β -каротен, астаксантин, фикоцианин, фикоеритрин, на полизахаридите, ненаситените мастни киселини, водните и липофилни извлекци и др.

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящата работа е да се изолира и охарактеризира във физиолого-биохимично и технологично отношение нов щам от род *Coelastrella*. Конкретните задачи за постигане на тази цел са:

1. Изолиране на нов щам от род *Coelastrella*, потенциален източник на каротеноиди.
2. Подбор на подходяща хранителна среда и въвеждане на *Coelastrella* sp. BGV в интензивна лабораторна култура.
3. Определяне на оптималните температурно – светлинни условия за оптимален растеж.
4. Физиолого-биохимично охарактеризиране на *Coelastrella* sp. BGV.
5. Индуциране на каротеноидната синтеза при *Coelastrella* sp. BGV.

3. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

3.1. Материал

Изследванията са проведени с новоизолиран български щам на род *Coelastrella*, означен като „*Coelastrella* sp. BGV“ в колекцията на Лаборатория по експериментална алгология при ИФРГ - БАН.

Исходната проба за изолиране на *Coelastrella* е събрана от метално корито край село Варвара, близо до град Септември (N 42° 10'; E 24° 0-7') от проф. дбн Георги Петков, за което му изказваме благодарност.

Изолирането беше извършено по метода на щрихите върху агарова среда до получаване на единични колонии (Andersen, 2005; Andersen & Kawachi, 2005). Новоизолираният щам е предварително определен пряко от събраната проба с помощта на светлинен микроскоп като представител на род *Coelastrella* от доц. д-р Б. Узунов от Софийския университет „Св. Климент Охридски“, за което му изказваме благодарност.

Щамът се съхранява в колекцията от работни щамове на Лаборатория “Експериментална алгология” при Институт по физиология на растенията и генетика – БАН - в течни култури и върху кос агар.

3.2. Методи за идентифициране на микроводорасловия материал

3.2.1. Светлинна микроскопия

Светлинномикроскопските изследвания са направени в Лабораторията по алгология на Катедрата по ботаника в Софийския университет „Св. Климент Охридски“ на нетрайни микроскопски препарати с Diapan Microscope Reichert с обективи 10x, 25x, 63x и 100x (с имерсионно масло).

Микрофотографиите са направени с камера Moticam 2000, прикрепена към микроскоп Motic BA 400 със специални адаптери. За обработка на снимките е използван компютърен софтуер “Motic Images Plus 2.0”. Клетъчните стени се оцветяват с метиленово синьо и скорбялата се оцветява с разтвор на Lugol (Ettl & Gärtner 1995, 2014).

3.2.2. Сканираща електронна микроскопия

За изследване със сканираща електронна микроскопия (SEM) клетките на водораслите се дехидратират в постепенно увеличаващи се концентрации на етанол (до 96% етанол) като се преминва през следните стъпки:

1. Суспензия от водорасли на даден вид се фиксират в 2.5% разтвор на глутаралдехид в какодилатов буфер от 2 до 24 часа.
2. След фиксирането глутаралдехидът се отпипетира и водорасловата суспензия се промива 3 пъти по 15 минути с какодилатен буфер.
3. Промитата проба се дофиксира в 2% OsO₄ в какодилатен буфер в продължение на 2 часа
4. След 2 часа OsO₄ се отстранява и пробата се промива 3 пъти по 15 мининути с дестилирана вода.
5. След промиването пробата се поставя в 70% алкохол. Следва възходяща алкохолна редица с цел обезводняване на пробата. След 70% алкохол пробата се поставя за 10 минути в 80%, после в 90% за 10 минути, после в 96% за 10 минути и накрая в 100% алкохол за 10 минути. Следва поставяне в смес от 100% алкохол и ацетон, 1:1 за 10 минути и накрая поставяне в ацетон.

6. Пробата, намираща се в ацетон, се изсушава в CPD (Critical point dryer).
7. Така изсушените проби са покривани със златен слой (2 nm) чрез йонно разпръскване с помощта на Bal-Tec SCD 050 и са наблюдавани със сканиращ микроскоп JEOL 6380 LV.

3.3. Молекулярно-генетичния анализ

3.3.1. Изолиране на геномна ДНК

Използван е кит - Genomic DNA Purification kit (Thermo Scientific)

3.3.2. Процедура

Тридесет mg биомаса получена от 20 ml свежа течна култура се стриват с мелница (Tissue Lyser) с помощта на метални съчки с размер 2.0 mm. След стриването към пробата се добавят 200 µl TE буфер (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH =8.0) и 400 µl лизис буфер (Genomic DNA Purification kit). Пробата се инкубира на 65°C в продължение на 10 минути, като периодично се обръща за по-добро лизиране на водорасловите клетки.

Незабавно се добавят 600 µl хлороформ, като пробата внимателно се смесва чрез инверсия (3-5 пъти). Следва центрофугиране при 10.000 rpm за 2 минути.

Приготвя се разтвор за преципитиране чрез смесване на 720 µl стерилна дейонизирана вода с 80 µl 10x концентриран разтвор за утаяване (Genomic DNA Purification kit) за всяка проба.

След центрофугирането се прехвърля горната водна фаза, съдържаща ДНК в нова епруетка и се добавят 800 µl прясно приготвен преципитационен разтвор. Смесва се внимателно чрез няколко инверсии при стайна температура в продължение на 1-2 минути и се центрофугира при 10,000 rpm (~ 9400 x g) в продължение на 2 минути.

Супернатантата се отстранява напълно, като получената утайка от ДНК на дъното не се оставя да изсъхне. Утаената ДНК се разтваря напълно в 100 µl разтвор на NaCl (Genomic DNA Purification kit).

Добавят се 300 µl студен етанол. Пробите се инкубират за 10 минути при -20°C. Следва центрофугиране при 10.000 rpm (9400 x g) за 4 минути. Етанолът се отстранява. Утайката се промива със 70% студен етанол, изсушава се за кратко на стайна температура и се разтваря в 50 µl стерилна дейонизирана вода.

Изолираната ДНК се проверява на 1% агарозен гел в 0.5X TAE буфер с цел проверка за наличие на РНК както и оценка на концентрацията. Допълнително ДНК е измерена спектрофотометрично на (Nano drop).

3.3.3. Амплификация на ДНК - PCR реакция:

1 μ l - ДНК (20ng); 2.5 μ l - buffer 10x (- $MgCl_2$); 0.75 μ l - $MgCl_2$ (0.375mM);

1.0 μ l – праймер ITS 1 (0.4 μ mol/ul); 1.0 μ l – праймер ITS 4 (0.4 μ mol/ul);

2.0 μ l - dNTP's (0.16 mM); 0.25 μ l - Taq полимераза (1.25 U)

16.5 μ l – ултра чиста вода.; Обем на реакцията - 25 μ l.

Праймерите ITS 1 (gtagtcatatgcttgctc) и ITS 4 (cttcgctcaattccttaag) са от района на вътрешният транскрипционен спейсър (ITS1) от геномната ДНК, разположен между 18S и 5.8S рРНК гени.

3.3.4. Условия за амплификация:

Начална денатурация 95°C за 10 минути; **циклиране** 35 пъти - денатурация на 95°C за 15 секунди, анилинг (хибридизация) на 52°C за 30 секунди и удължаване на веригата (синтез) на 72°C за 1.5 минути; **финално удължаване на веригата** за 7 минути на 72°C.

Използвана е PCR машина Quanta Biotech (LKB). Получените фрагменти се проверяват на 1% агарозен гел, изрязват и изолират.

3.3.5. Изрязване и пречистване на PCR фрагменти

Получените ДНК фрагменти са изолирани от 1% агарозен гел по протокола на GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific).

3.4. Култивиране на водораслите

3.4.1. Подържане и лабораторно култивиране на микроводораслите

Поддържането на опитния щам и култивирането на водораслите е осъществявано на следните съоръжения, конструирани в ИФРГ – Лаборатория по Експериментална алгология:

1. Луминистат (**Фиг. 3**): използван е за съхранение и поддържане на опитните щамове върху кос агар и на течни хранителни среди при екстензивни условия – температура 20°C и осветеност 3000 Lx.

2. Блок за интензивно култивиране (**Фиг. 4**): използван е за култивиране на водораслите при интензивни условия – предварително зададена температура, едностранно и (или) двустранно осветяване (8000 Lx или 2 пъти по 8000 Lx на повърхността на култивационните съдове) и продухване с въздух, обогатен с 0,5-1% CO₂. Култивирането е осъществявано в плоско-паралелни съдове с работен обем 200 ml, снабдени с барбутъри.



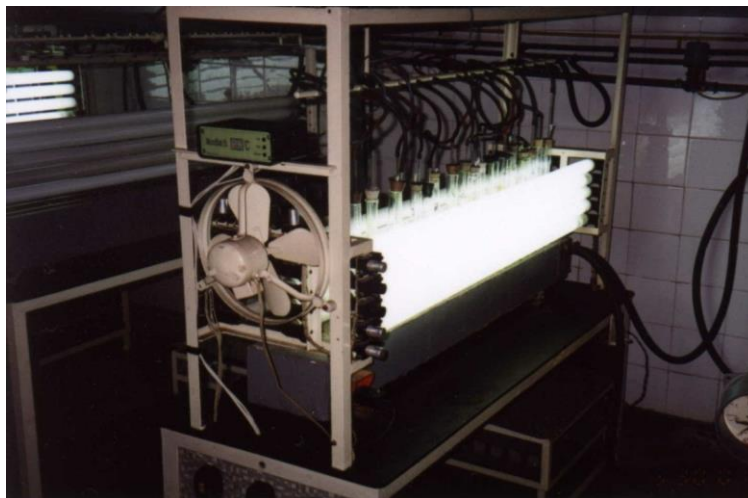
Фиг. 3. Луминистат за съхранение и поддържане на водорасловите култури при екстензивни условия.



Фиг. 4. Блок за интензивно култивиране на микроводорасли

3. Блок с температурен градиент (**Фиг. 5**): използван за интензивно култивиране на водораслите при условия на температурен градиент – от 15 до 50°C,

осветеност 8000 Lx и 2 пъти по 8000 Lx и продухване с въздух, обогатен с 0,5-1% CO₂. Култивирането е осъществявано в култивационни съдове с работен обем 100 ml.



Фиг. 5. Блок за култивиране на микроводорасли при условия на температурен градиент

3.4.2. Хранителна среда

За съхраняване и поддържане на опитния щам е използвана хранителна среда на Šetlik (1967), модифицирана от Георгиев и др. 1978г. (т.нар. Чешка рецепта, означена в текста като ChR) с концентрация на хранителните елементи 1/8. За интензивно култивиране са използвани среда BG11 (Rippka et al. 1979), BG11 с 1 гр. NaHCO₃ и ½ ChR.

3.4.3. Техника на култивиране

Култивирането на водораслите е осъществявано при стерилни условия (хранителни среди, култивационни съдове и пр.).

Съхраняваният върху кос агар щам е смиван с хранителна среда и култивиран при екстензивни условия на луминистат в ерленмайерови колби с обем 100 ml в продължение на 48 часа, след което е прехвърлян в култивационен съд и култивиран при интензивни условия в описаните по-горе инсталации.

3.4.4. Измервания, анализи и обработка на получените резултати

Концентрацията на сухото водораслово вещество (АСВ) е определяна тегловно. За тегловното определяне в предварително тарирани центрофужни епруветки се поставят по 0,5 ml 11,5% оцетна киселина и 10 ml водораслова суспензия. След престояване от 20

минути епруветките се центрофугират 10 минути при 5500 g и се сушат при 105°C до постоянно тегло, след което се теглят.

Скоростта на растеж [μ] е изчислявана по формулата:

$$\mu = \frac{(C_{кр.} - C_o)}{C_o} = \frac{\Delta C}{C_o}, \text{ където:}$$

- C_o е концентрацията на сухото водораслово вещество в началото на изследвания период;

- $C_{кр.}$ е концентрацията на сухото водораслово вещество в края на изследвания период

Съдържанието на белтъци е определяно по метода на Lowry (1951). Водораслова суспензия, съдържаща не повече от 1 mg сухо водораслово вещество се залива с 1 ml кипящ метанол. Центрофугира се 10 минути при 5500 g, като супернатантата се отделя. Към обезцветената утайка се добавят 4 ml 1N натриева основа и се оставя 20 минути на кипяща водна баня за хидролиза. Хидролизатът се центрофугира 10 минути при 5500g и супернатантата се отлива в мерителна епруетка, оставя се да изстине и се долива до 4 ml с дестилирана вода. Към 0,3 ml от така получения хидролизат се прибавя 1,5 ml водно-меден реактив ($\text{NaCO}_3 + (\text{Na-K тартарат} + \text{CuSO}_4)$). Оставя се да престои 45 минути, а след това се прибавя 0,15 ml разтвор на Фолин – Чиокалтео. Изчаква се 90 минути, за да се получи стабилно оцветяване и се измерва екстинкцията на Спекол при 750 nm срещу контрола, съдържаща 0,3ml 1N натриева основа, 1,5 ml водно-меден реактив и 0,15 ml реактив на Фолин. По стандартна крива се отчита количеството белтък в mg.

Въглехидратното съдържание е определяно по фенол-серния метод на DuBois et al. (1956). Към 0,5 ml от пробата се добавят 0,5 ml 5% разтвор на фенол и 2,5 ml к. H_2SO_4 . След инкубация за 30 минути на стайна температура се измерва екстракцията при 490 nm и по стандартна крива (глюкоза) се отчита количеството на въглехидратите.

Съдържанието на общи липиди е определяно по метод, описан от Петков (1990). При него 20-30 mg биомаса се екстрахират двукратно със смес от хлороформ и метанол (2:1) при съотношение биомаса/екстрагент 1:10 (I екстракция) и 1:5 (II екстракция). Отделянето на извлекът - метаноловите екстракти от клетките се осъществява след центрофугиране. Следва разделяне на хлороформа от метанола в делителна фуния с 0,2

М разтвор на натриев хлорид-1/5 от обема на екстракта. Обединените липидни екстракти се изпаряват при температура 40°C на ротационен вакуумен изпарител, след което се пречистват чрез реекстракция с хлороформ. Количеството на липидния екстракт се определя тегловно.

За определяне на мастните киселини, получената проба липиди е подлагана на преестерификация със смес от метанол, наситен с хлороводород, при което се извършва метилиране на мастните киселини. Така получените метилови естери на мастните киселини са екстрахирани с диетилов етер и пречистени чрез тънкослойна хроматография. Използвана е системата от разтворители хексан/етилов етер – 10:1 и свидетел. Газхроматографският анализ е извършен на апарат Perkin-Elmer 3920В, с колона SE52/DEGS 10% с дължина 360cm, при температура 195°C и налягане на подвижната фаза (газ носител – азот) – 3 atm.

Съдържанието на пигменти във водорасловата биомаса е определяно спектрофотометрично след екстракция с кипящ метанол. 2-5 mg водораслова биомаса се залива двукратно с по 3-4 ml кипящ метанол. Пробата се центрофугира при 5500 g за 5 минути и обединените екстракти се довеждат до определен краен обем. Количеството на пигментите се изчислява по формулите на Mackinney (1941):

$$X_{лф. "a"} [\%] = \frac{[(0.0127.E_{665}) - (0.00269.E_{645})].V_{кр.}.100}{ml.суспензия.ACВ}$$

$$X_{лф. "b"} [\%] = \frac{[(0.0229.E_{645}) - (0.00468.E_{665})].V_{кр.}.100}{ml.суспензия.ACВ}$$

$$Каротеноиди [\%] = \frac{[E_{460} - (3.197.A + 130.3.B)].V_{кр.}.100}{200.ml.суспензия.ACВ}$$

$$A = [(0.0127.E_{665}) - (0.00269.E_{645})]$$

$$B = [(0.0229.E_{645}) - (0.00468.E_{665})]$$

Микроскопският контрол е осъществяван с микроскоп NU2 – Karl Zeiss – Jenna при увеличение до 780X. Ежедневно е контролирано биологичното състояние на културите - фази на развитие, степен на синхронност, алгологично и бактериално замърсяване и др.

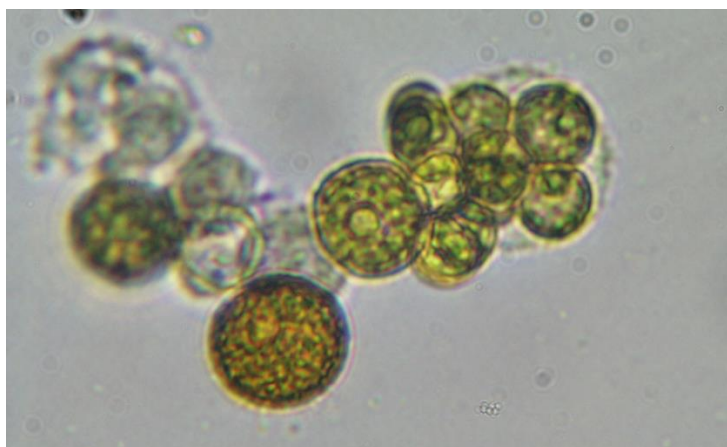
Всички опити са извършвани най-малко в две повторения. Резултатите са представени като средни стойности и стандартни отклонения ($\pm$;SD), а на приложените графики са представени осреднените данни.

4. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

4.1. Изолиране на нов щам от род *Coelastrella*

Използваният в изследването щам *Coelastrella* sp. BGV е новоизолиран от територията на България като за първи път у нас видовете на рода, които са типично аеротерестриални (Ettl & Gärtner 1995, 2014) са намерени във водна среда в метално корито (Dimitrova et al. 2018) - **Фиг. 6.**

Изолирането, направено по метода на щрихите, е успешно и щамът е въведен в култури за биохимични и физиологични проучвания. Той се съхранява в живо състояние в колекцията на секцията по Експериментална алгология на ИФРГ-БАН.



Фиг. 6. *Coelastrella* sp. BGV в изходната проба.

4.2. Таксономическа идентификация на новоизолирания шам въз основа на светлинна микроскопия, сканираща микроскопия и молекулярно-генетични методи

Coelastrella Chodat е род на зелените водорасли от отдел Chlorophyta и е устроена по т.нар. кокален (=кокоиден, клетъчен) морфологичен тип. Това означава, че клетките са лишени от всякакви органели за движение и са с добре оформена клетъчна стена. Често именно особеностите на клетъчните стени се използват за таксономичната идентификация на видовете зелени водорасли наред с няколко други цитологични и размножителни особености. Род *Coelastrella* се отличава със скулптурираната си клетъчна стена с ясно изразени израстъчни удебеления, наречени *ребра*. Често те се означават още като *меридионални ребра* или *надлъжни ребра* (Ettl & Gärtner 1995, 2014). Съществуват още няколко рода зелени кокални водорасли, които имат подобни ребра. Това са родовете *Scotiella* Fritsch, *Scotiellopsis* Vinatzer и *Graesiella* Kalina et Punčochářová (Kalina & Punčochářová 1987, Ettl & Gärtner 1995, 2014). Kaufnerová & Eliás (2013) синонимизират *Scotiellopsis* Vinatzer с по-рано описания род *Coelastrella* и в резултат на това понастоящем броят на видовете в рода се увеличава с представителите, които по-рано са били отнасяни към род *Scotiellopsis* (вж. детайли в главата Литературен обзор). Съвременната таксономия на тези родове с частично преразпределение на таксоните се основава главно на изследванията на Hanagata (1998) и Hegewald & Hanagata (2000, 2002), а през последните години тя е обсъждана в детайли от Tschaikner et al. (2007a, b, 2008). Последните автори описват новия вид *Coelastrella aeroterrestrica* в допълнение към вече известната от почвени местообитания *Coelastrella terrestris* (Reisigl) Hegewald et Hanagata (с базиним *Scotiella terrestris* Reisigl и синоними: *Scotiello cystis terrestris* (Reisigl) Fott, *Scotiellopsis terrestris* (Reisigl) Punčochářová et Kalina и *Scenedesmus terrestris* (Reisigl) Hanagata). Двата вида са ясно различни по своите морфологични особености, установени със светлинно-микроскопски (LM) и сканиращо-микроскопски изследвания (SEM) - Gärtner & Ingolić 1993, Tschaikner et al. 2007a. Те са изредени последователно по-долу в текста.

Coelastrella terrestris се характеризира с широкоелиптични или лимоновидни клетки, които са 7-9.5 µm широки и 9.5-13.5 µm дълги. Меридионалните ребра на клетъчните стени на живите клетки са труднозабележими в светлинен микроскоп и затова обикновено се прибегва до оцветяването им с Метиленово синьо за по-ясно открояване. Те по-лесно се забелязват при наблюдение върху мъртви, празни клетки. При използване

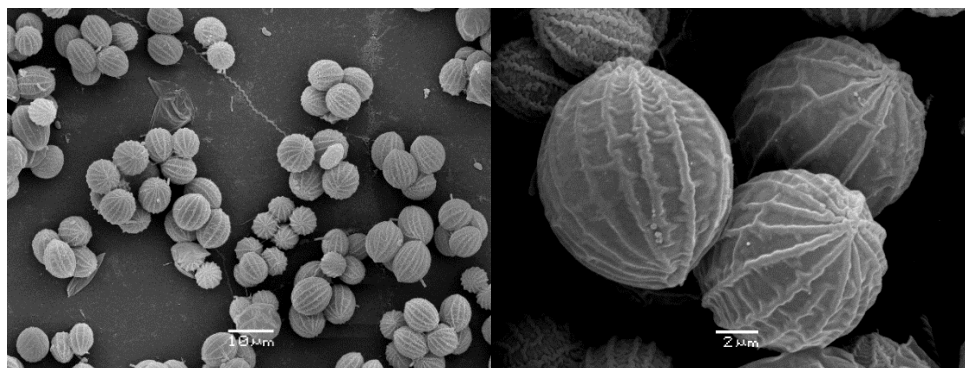
на сканираща микроскопия ребрата, които са от 8 до 14 на брой, се виждат по-ясно. Възможно е някои от ребрата да не достигат до краищата (полюсите на клетките), но това най-вероятно се определя от условията на култивиране, както по-рано са предположили Tschaikner et al. (2007a). Хлоропластът (пластидът) е парietален (постенен). Той е един във всяка млада клетка, но се разпада на фрагменти с остаряването на клетката. Протеиновият пиреноид е един, ясно забележим и носи обвивка от две – три скорбелни пластинки. Понякога в хлоропласта има допълнителни дребни скорбелни зърна. Размножаването е чрез 2-4-(8) автоспори.

Coelastrella aeroterrestica се характеризира с кълбовидни (9.5-13.5 μm в диаметър) и, по-рядко, широкоелипсоидни клетки (5.5-7 x 5.5-8 μm). По тях понякога се виждат леки удебеления на клетъчните стени. Надлъжните ребра на клетъчните стени на живите клетки са много фини, нежни и почти невидими в светлинен микроскоп, дори при оцветяване с Метиленово синьо. В същото време, фината мрежа на ребрата, които не надхвърлят 6 на брой, е добре видима при използване на сканираща микроскопия. Хлоропластът е парietален чашковиден и е дълбоко наделен в старите клетки. Пиреноидът е само един, но е голям, изпъкващ и е покрит с две до пет скорбелни пластинки. Понякога в хлоропласта се виждат допълнителни дребни скорбелни зърна. Размножаването е чрез 2-4-(8) автоспори.

По светлинно-микроскопските си характеристики (форма, големина на клетките, пластид и пиреноид) и най-вече по забележимостта на меридионалните ребра на нетрайните препарати в светлинен микроскоп, изолираният щам се доближава максимално до *Coelastrella terrestris*. По време на култивирането многократно са установявани автоспори – миникопия на майчините клетки, които служат за размножаването на вида (Фиг. 6). Необходимо е да се отбележи, че този тип размножаване, характерен за родовете *Chlorella* и *Scenedesmus* и за други зелени кокални родове, всъщност е в основата на масовите култури (Graham et al. 2009, Темнискова, Стойнева 2011, Lee 2018).

Прилагането на сканираща електронна микроскопия за морфологичното охарактеризиране на *Coelastrella* sp. BGV показва ясно наличието на широкоелипсоидни или лимоновидни клетки с по 8-14 меридионални ребра на клетъчната стена (Фиг. 6, 7). Въз основа на това изследваният от нас щам се доближава до вида *Coelastrella terrestris* (Ettl & Gärtner 1995, 2014). В същото време, в нашите материали се виждат къси ребра, които се разполагат перпендикулярно на

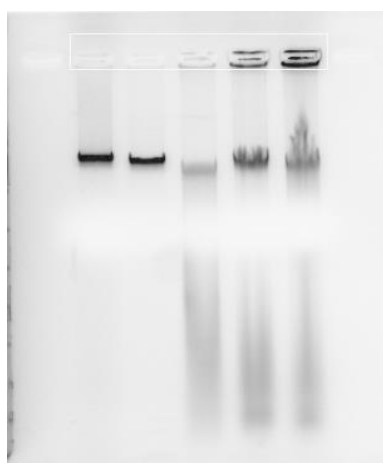
меридионалните ребра и ги свързват. Тази структура не е типична за целия род *Coelastrella* и налага провеждането на допълнителни проучвания и консултации със специалисти-таксономи.



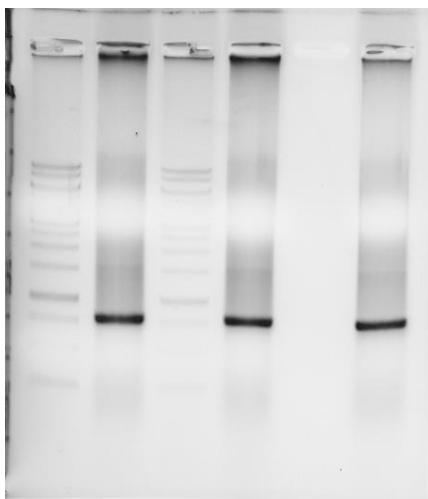
Фиг. 7. Клетки на *Coelastrella* sp. BGV под сканиращ електронен микроскоп

Междувременно, за по-голяма достоверност на таксономичната идентификация, бяха предприети стъпки за молекулярно-генетичното идентифициране на вида (**Фиг. 8 - 11**). Съобразно първоначалните данни от секвенирането, новоизолирания щам попада в една група с последователности от района на 18S на видовете *Tetrademus obliquus* KT778108, *Chlorella sorokiniana* KY229197 и *Scenedesmus quadricauda* KT77810, което не ни дава възможност за по-детайлно идентифициране.

Тези резултати съответстват на резултатите, получени досега за отделни щамове на род *Coelastrella* (за детайли вж. Kaufnerová & Eliás 2013), и налагат провеждането на допълнителни експерименти с генни фрагменти от различни райони на генома.

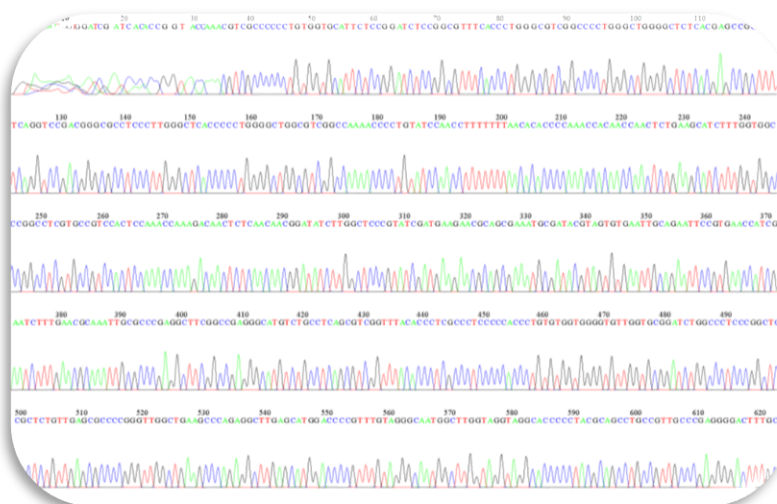


Фиг. 8. Геномна ДНК от видовете *Chlorella vulgaris* CAUPH1993 (3), *Desmodesmus communis* H522(4), *Coelastrella* sp. BGV (5). Позиции 1 и 2 са маркерни ДНК с концентрации 20ng и 50ng



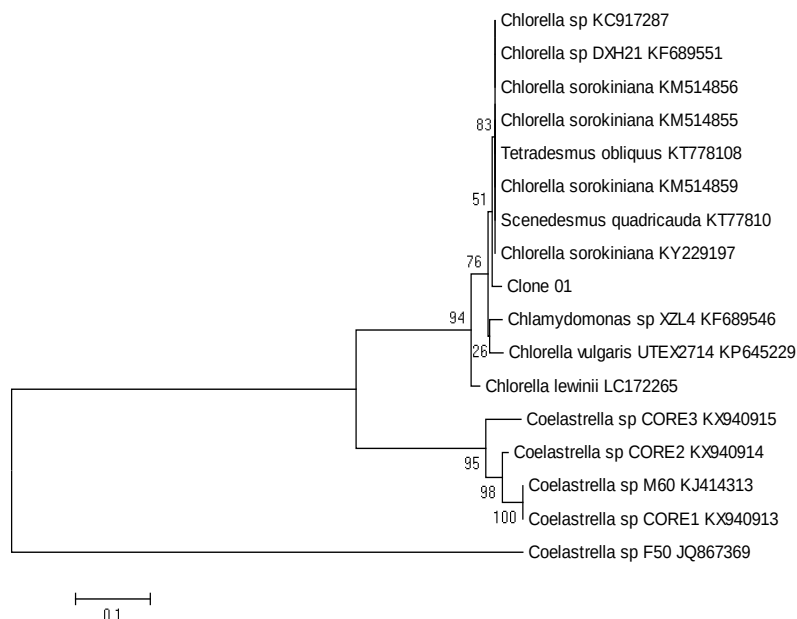
Фиг. 9. PCR продукти след амплификация на геномна ДНК от *Coelastrella* sp. BGV с праймери от района на ITS (вътрешният транскрибционен спейсър).

На позиции 1 и 3 е нанесен 1кб. ДНК маркер; позиции 2, 4 и 6 –20 µl PCR продукт от *Coelastrella* sp. BGV с праймери ITS1 и 4. Фрагментът с големина 750 нуклеотида е изрязан от гела, пречистен и секвениран. **Фиг. 10.**



Фиг. 10. Нуклеотидна последователност на секвенирания участък

4.3. Дендрограма на сходството резултат на клъстерен анализ



Фиг. 11. Дендрограма на сходството резултат на клъстерен анализ на новоизолираният щам *Coelastrella* sp. BGV, отбелязан в дървото като Clone 01 със секвенции с най-висока хомоложност според BLAST резултата.

4.4. Култивиране на микроводораслите от щам на *Coelastrella* sp. BGV

Култивирането на микроводорасли на открито е свързано с големи сезонни и денонощни флуктуации на светлината и температурата. Поради това използваните за масово култивиране щамове трябва да имат големи адаптивни възможности за растеж в широки температурни и светлинни граници, като при това трябва да запазят химичния си състав в относително тесни граници. Не на последно място са технологичните показатели – добра съхраняемост в състояние на суспензия, отсъствие на лепливост и пр.

Въвеждането в интензивна култура на нов щам предполага подробното му охарактеризиране във физиолого-биохимичен и биотехнологичен аспект. Във връзка с това са изследвани ролята на хранителната среда и температурата върху скоростта на растеж, продуктивността и биохимичния състав на биомасата.

4.4.1. Подбор на хранителна среда

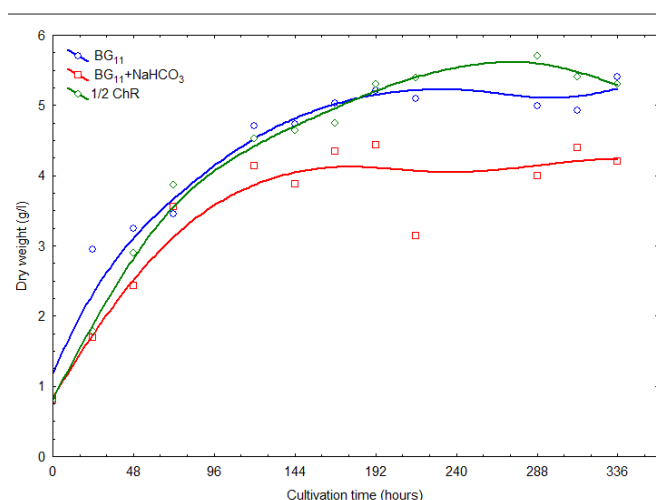
Един от най-съществените показатели, определящ интереса към даден водораслов вид, както за теоретични изследвания, така и за масово култивиране е скоростта на растеж [μ]. Затова първият етап на работата ни целеше охарактеризиране на скоростта

на растеж и продуктивността на проучвания шам – *Coelastrella* sp. BGV в зависимост от използваната хранителна среда.

Първоначално не-аксенични култури от *Coelastrella* sp. шам BGV се отглеждат автотрофно в три различни хранителни среди (**Фиг. 13**): BG₁₁ (Rippka et al., 1979) BG₁₁ + 1 g/l NaHCO₃ и среда на Šetlik (1967), модифицирана от Георгиев и др., 1978 г. (отбелязано в текста с абривиатурата ChR) с ½ концентрация на хранителни вещества (½ ChR) за 336 часа (14 дни), в режим на нарастваща плътност.

Култивирането е проведено на инсталация за интензивно култивиране при температура 36°C и осветеност 8 000 Lx.

Хранителната среда на Šetlik (1967), модифицирана от Георгиев и др. (1978), отбелязана като ChR, в различни концентрации се използва широко за масово отглеждане на микроводорасли от клас Chlorophyceae, основно *Chlorella* и *Scenedesmus* (Pilarski 1994). Според оригиналната рецепта концентрацията на хранителните вещества в нея е около 7,5 g/l. За сравнение BG₁₁ (Rippka et al. 1979); и BG₁₁ + 1 g/l NaHCO₃ съдържат съответно 4,4 пъти и 2,8 пъти по-малко количество минерални вещества. За първоначалните изследвания с *Coelastrella* sp. BGV избрахме средите BG₁₁, BG₁₁ + NaHCO₃ и ½ ChR на базата на предишния ни опит с други зелени микроводорасли (Gacheva & Pilarski 2008, Gacheva et al. 2015). Два пъти по-разредената среда (½ ChR) осигурява най-висока скорост на растеж - 6,57 и най-високо съдържание на пигменти в ранна стационарна фаза ($1.15 \pm 0,1\%$ от сухото тегло).



Фиг. 12. Растежни криви на водорасловата култура в зависимост от използваната хранителна среда (1/2 ChR, BG-11, BG-11+ NaHCO₃).

Най-продължителна линейна фаза на растеж и максимална плътност на водорасловата култура се достига при използване на чешката хранителна среда, която е и с най-високо общо солево съдържание (**фиг. 12**). Устойчивостта и добрият растеж на щама при повишена концентрация на минералните елементи в хранителната среда представляват несъмнен интерес за масовото култивиране на открито, особено при използване технологията за култивиране на тънък слой (5-10 mm) и при повишена плътност (8-12 g/l) на водорасловата суспензия (Livansky & Pilarski 1993, Livansky et al. 1993, 1995, Georgiev et al. 1978).

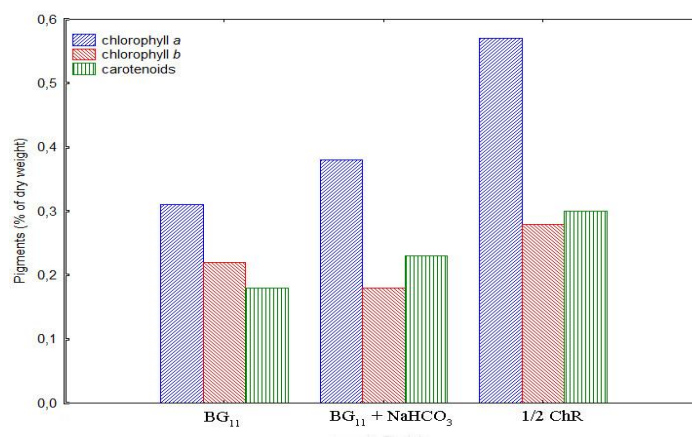
С този експеримент беше установена оптималната за растежа на *Coelastrella* sp. BGV хранителна среда. (**Фиг. 13**).



Фиг. 13 *Coelastrella* sp. BGV култури, отглеждани в среди BG₁₁; BG₁₁+1 g/l NaHCO₃ и 1/2 ChR, в началото - 0 ч (вляво) и в края на експеримента - 336 ч (вдясно).

Освен растежните показатели от съществено значение е и качественият състав на получаваната биомаса. Поради високата пластичност на обмяната при водораслите могат да се очакват разлики в съдържанието на отделните метаболити при различните хранителни среди.

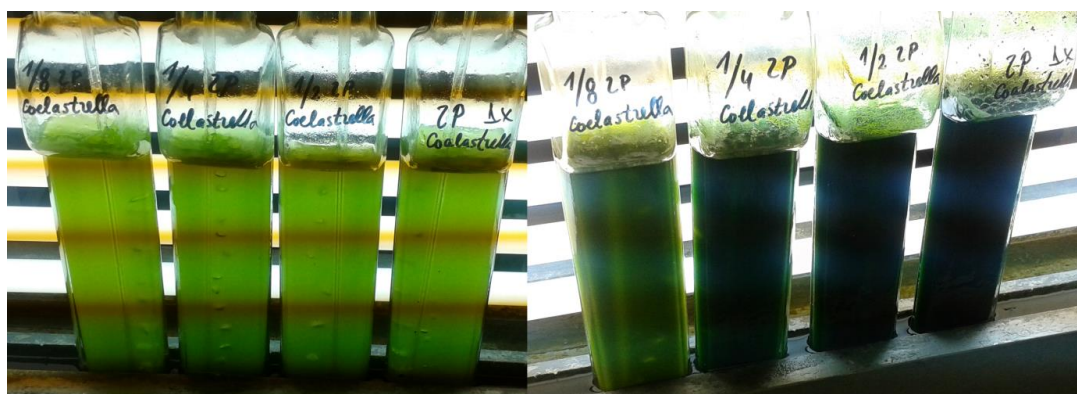
Получените резултати показват, че съдържанието на каротеноиди е по-високо при използването на 1/2 ChR (**Фиг. 14**).



Фиг. 14. Пигментно съдържание (% от сухото тегло) в *Coelastrella* sp. BGV в зависимост от минералната среда.

По-добрата продуктивност и значително по-високото каротеноидно съдържание на *Coelastrella* sp. BGV при култивиране на среда ChR ни даде основание за използването ѝ в следващите експерименти.

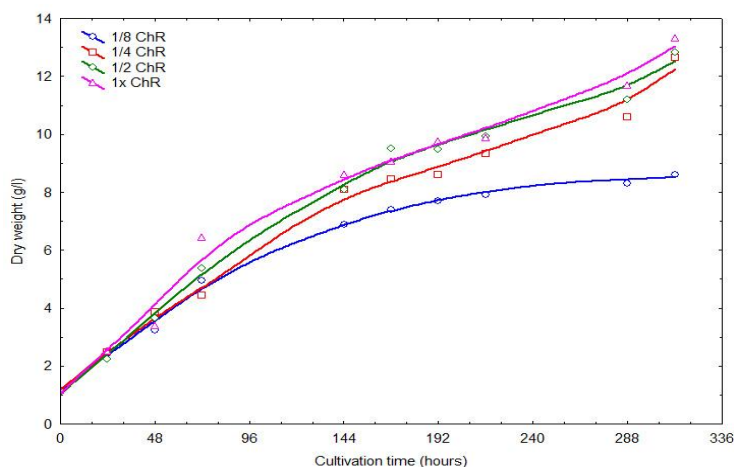
Освен вида на хранителната среда, от основно значение е и установяването на оптималната концентрация на минералните елементи в нея за постигане на максимален растеж и оптимално съдържание на основните клетъчни метаболити в *Coelastrella* sp. BGV (Фиг. 15).



Фиг. 15. *Coelastrella* sp. BGV култивирана в 1/8; 1/4; 1/2 и пълна доза ChR, в началото - 0 h и 168 h.

При нито едно от разрежданията през първите 48 часа след инокулацията, нямаше забавяне на растежа, което показва, че клетките на *Coelastrella* sp. BGV се адаптират много бързо към различни солеви натоварвания (Фиг. 16). Интензивният растеж на културите продължава за повече от 288 часа, с изключение на вариант 1/8 ChR (192 часа). Повишените концентрации на минералните елементи в средата (1/2 ChR и 1x ChR)

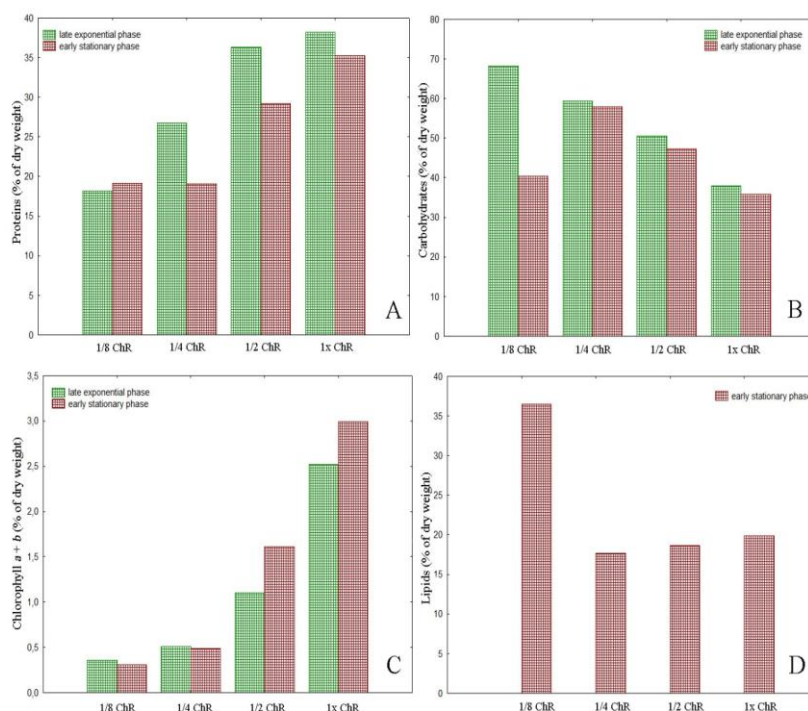
осигуряват добър растеж на щама, което е от интерес за открито масово производството на микроводораслова биомаса (Livansky et al. 1993, 1995).



Фиг. 16. Растежни криви на *Coelastrella* sp. BGV при различни концентрации на минерална среда (1/8; 1/4; 1/2 и пълна доза ChR).

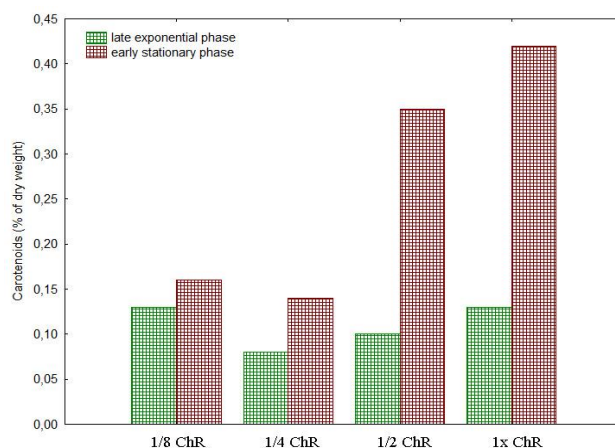
Белтъците на *Coelastrella* sp. BGV варират от 18,2 до 38,2% от сухото тегло в края на експоненциалната фаза и от 19,1 до 35,3% в началото на стационарната фаза. Повишената концентрация на хранителни вещества в средата стимулира синтеза на протеини, независимо от етапа на растеж, но със стареенето на културата нивата на протеините намаляват, с изключение на варианта с 1/8 ChR (**Фиг. 17**). Получените резултати за 1/4 ChR са съпоставими с резултатите, получени от Iyer et al. (2015) за протеиновото съдържание на *Coelastrella oocystiformis* култивирана в среда BG₁₁ и 3% CO₂ (27% от сухото тегло).

Въглехидратите са най-разпространените основни метаболити в клетките на *Coelastrella* sp. BGV в количествено отношение (35,8 - 68,2% от АСВ). Получените от нас резултати съответстват на данните на Iyer et al. (2015), които също определят най-висок процент на въглехидрати (44% от сухото тегло) в *Coelastrella oocystiformis*. В нашите изследвания може да се отбележи постепенното намаляване на нивата на въглехидратите с увеличаването количеството на минералните елементи в средата (**Фиг. 17В**). При 1/8 ChR се стимулира синтеза на въглехидрати и липиди - **Фиг. 17В и 17D** (68,2% и 36,5%, съответно). Като етапът на растеж се отразява на въглехидратния синтез най-значително във варианта 1/4 ChR и при двете фази.



Фиг. 17. Биохимичен състав на *Coelastrella* sp. BGV в зависимост от концентрацията на хранителната среда. А - протеини; Б - въглехидрати; С - хлорофил а+б; D - липиди (% от сухото тегло). Зелените барове съответстват на късната експоненциална фаза, а червените барове – на ранната стационарна фаза.

Съдържанието на липиди в зависимост от концентрацията на хранителната среда при *Coelastrella* sp. BGV варира от 17,7% до 36,5% от сухото тегло в ранна стационарна фаза (фиг. 17D). Най-ниската концентрация на хранителни вещества (1/8 ChR) стимулира натрупването на липиди. Ние установихме много по-високи стойности на липидите (36,5%) в сравнение нивата за терморезистентния щам *Coelastrella* sp. F50 (Hu et al. 2013, Karpagam et al. 2018) - 16% от АСВ в ранна стационарна фаза и 22% след солеви стрес и висок интензитет на светлината. Neofotis et al. (2016) показват, че няколко щамове *Coelastrella* се „представят добре“ не само в лабораторията. DOE0202 щам също е положително тестван в малки открити инсталации. Авторите считат, че тези щамове *Coelastrella* могат да бъдат използвани за получаване на биогорива и/или за производство на биопродукти.



Фиг. 18. Съдържание на каротеноиди (% от сухото тегло) на *Coelastrella* sp. BGV в зависимост от концентрацията на хранителната среда. Зелените барове съответстват на късната експоненциална фаза, а червените барове – на ранната стационарна фаза.

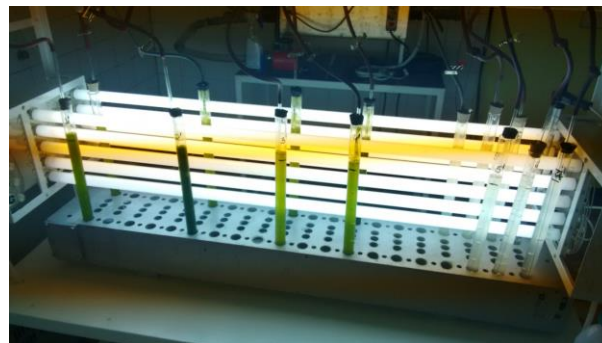
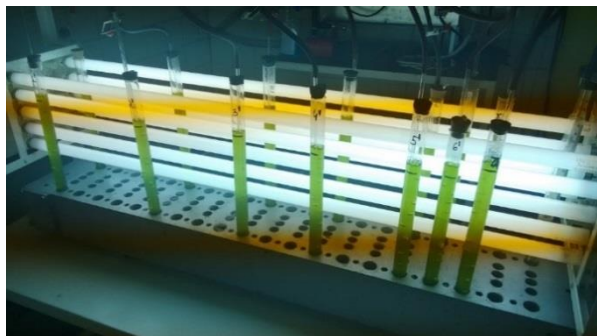
Пигментите (хлорофил a+b и каротеноиди) на *Coelastrella* sp. BGV се увеличават с увеличаване на концентрацията на минералните елементи в средата, а при по-концентрираните среди (1/2x и 1x) и със стареенето на културите (**Фиг. 17C** и **Фиг. 18**). Съдържанието на каротеноиди е по-високо в стационарните, в сравнение с експоненциалните култури, като е най-високо при култивиране на водораслото в неразредената среда (1x ChR). Където тя е с 3 пъти по-високо каротеноидно съдържание.

4.4.2 Растеж и биохимичен състав на *Coelastrella* sp. BGV в зависимост от светлинно-температурните условия

Адаптивните възможности на микроводораслите са от ключово значение за тяхното производствено култивиране на открито, където ежедневните и сезонни колебания в температурата и светлината са значителни. След определяне на вида и солевата концентрация на хранителната среда, от съществено значение е определяне на светлинно-температурния диапазон за оптимален растеж на *Coelastrella* sp. BGV, в т.ч. и границите на преживяемост и вариабилност в биохимичния състав на основните клетъчни метаболити.

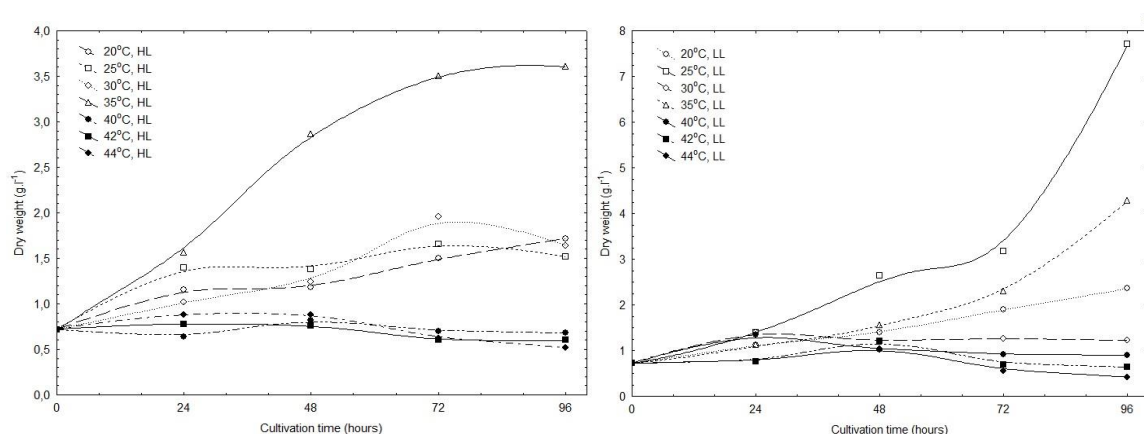
За определянето на основните температурно – светлинни зависимости на *Coelastrella* sp. BGV е работено на блок с температурен градиент при зададените температури в интервала 20 - 44°C с две светлинни интензивности (едностранно осветяване - 8000 Lx (ниско осветяване, обозначено с LL), и двустранно осветяване - 2 x

8000 Lx (високо осветяване, обозначено с HL) и хранителна среда $\frac{1}{2}$ ChR. Въглеродният източник е 2% CO₂, добавян във въздуха за барботиране. Култивирането е проведено в продължение на 96 часа, като растежът е контролиран тегловно ежедневно, а биохимичните анализи са проведени в края на експеримента (фиг. 19).



Фиг. 19. Култивиране на *Coelastrella* sp. BGV на температурен блок – 0 час (вляво) и 96 часа (вдясно).

Растежът на *Coelastrella* sp. BGV с двустранно и едностранно осветление е показан на **Фиг. 19**. Експериментите показват ясно, че независимо от осветеността, растежът на водораслите спира напълно, когато се отглеждат при температури 40, 42 и 44°C. Растежът е оптимален в интервала 20 - 35°C, което потвърждава, че *Coelastrella* sp. BGV е силно адаптивен и по този начин е подходящ за открито култивиране. Оптималната температура на растеж при едностранно осветление е 25°C, докато при двустранното осветление тя е 35°C.



Фиг. 20. Растежни криви при двустранно (HL вляво) осветление (2 x 8000 Lx); Растежни криви при едностранно (LL вдясно) осветление (8000 Lx)

При проведените експерименти беше установено, че при 40°C съдържанието на белтъци достига максимално ниво. При тази температура и двустранно осветление съдържанието е 54%. Ако осветлението е едностранно, съдържанието на протеини е 57%, което поставя висок рекорд за този щам.

Температурата, при която съдържанието на въглехидрати е най-високо е 30°C, както за двустранното (50,7%), така и при едностранното (45,7%) осветление, докато при високите температури се наблюдава значително намаляване на съдържанието им – при 44°C и двустранно осветяване - 11,8%, а при едностранното осветление и 42°C - 15,9%.

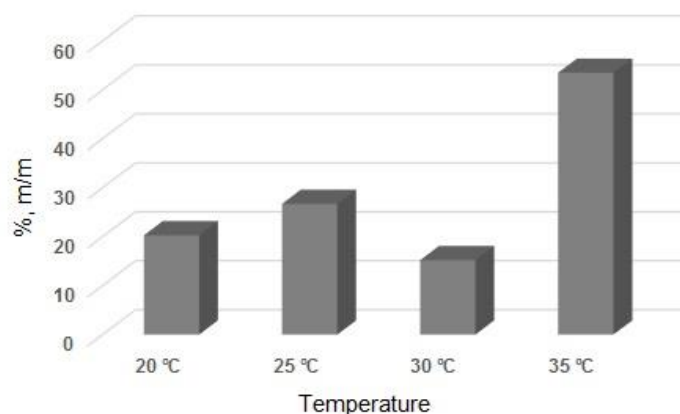
Хлорофилът и каротеноидите са с неубедителни различия при двустранното осветяване. Има някои забележими и измерими разлики при едностранното осветление. Общото съдържание на пигменти при 20°C е отбелязано като най-ниската стойност. Пикът на хлорофилите a и b е при 25°C, след което започва да намалява. При трите крайни температури (40, 42 и 44°C) съдържанието на пигменти не може да се измери - макроскопски културите изглеждат бели.

Съдържанието на липиди варира значително. За двустранното осветяване то е високо - 37% при 25°C, а най-ниско е при 40°C - 10,3%. Неочаквано, при едностранно осветяване и 40°C установихме много високо съдържание на липидите - 40%. Ще бъдат необходими още експерименти, за да се прецизира дали тази вариабилност в съдържанието на липиди следва стабилна тенденция.

Според направените анализи с газова хроматография, основните мастни киселини на *Coelastrella* sp. BGV са миристинова (14:0), палмитинова (16:0), стеаринова (18:0),

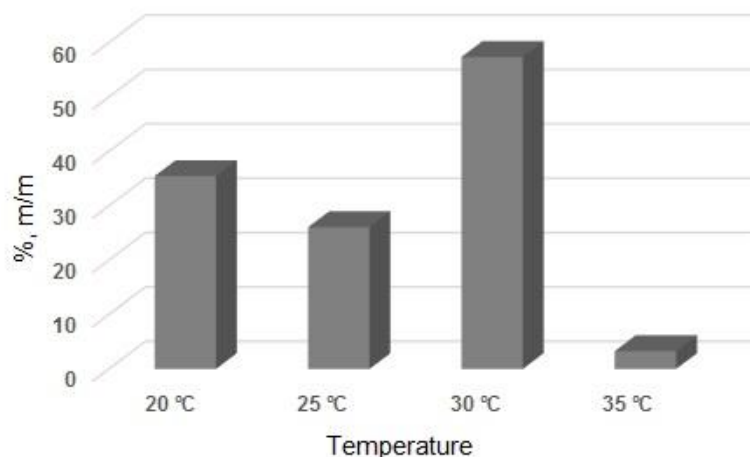
олеинова (18:1), лиолова (18:2), алфа-линоленова (α -18:3). Нашите резултати съответстват с тези, определени от Abe et al. (2007). Открита е една мастна киселина (неизвестна досега), чието съдържание варира в широки граници в зависимост от приложените условия на култивиране. Според нашите предварителни проучвания ние предполагахме, че това може да е мастна киселина с 16 въглеродни атома и повече от една двойна връзка (вероятно 16:2 или 16:3). В тази насока работата по прецизиране на мастно-киселинния състав на щама ще продължи.

Мастно-киселинното съдържание също се влияе от условията на култивиране. Миристиновата и стеариновата киселини имат най-ниските нива. Палмитиновата киселина варира от 15,2% при 30°C и 8 000 Lx до 53,5% при 35°C и 8000 Lx (**фиг. 21**).



Фиг. 21. Съдържание на палмитинова киселина в клетките на *Coelastrella* sp. BGV, култивирана при различни температури и ниска интензивност на светлината (8 000 Lx).

Значително намаление в съдържанието на олеиновата киселина се наблюдава при 30°C и едностранно осветление. Количеството на лиоловата киселина е значително повлияно от интензитета на светлината, тя се увеличава двойно при 25°C и двустранно осветление и намалява при 20°C. Алфа-линоленовата киселина показва най-голямата промяна от 3,3% до 57,4% (**Фиг. 22**).



Фиг. 22. Съдържание на Алфа-линоленова киселина в клетките на *Coelastrella* sp. BGV, култивирана при различни температури и ниска интензивност на светлината (8 000 Lx).

Най-съществената промяна е в съдържанието на палмитинова, олеинова и алфа-линоленова киселини в много малък температурен диапазон (30-35°C), за което са необходими по-обстойни изследвания. Като се има предвид, че това е оптималната температура за отглеждане, може да се каже, че тези промени не са свързани с въздействие на стресов фактор, но би могло да се счита за характеристика на вида.

Нашите резултати показват, че екстремните температури (40, 42 и 44°C) са в състояние да подтиснат растежа на щам *Coelastrella* sp. BGV, като стабилен растеж е постижим в диапазона от 20-35°C. Това показва, че щамът *Coelastrella* sp. BGV е адаптивен и използваем за отглеждане в открити системи, където светлинно-температурните условия варират.

Интересен факт, който трябва да се отбележи, е че след свалянето на опита водораслите, които бяха отглеждани при температури 40, 42 и 44°C и при двете светлинни интензивности са силно изсветлели и изглеждат отмрели. Но, още на втората седмица, при оставянето им на стайна температура и дневна светлина, културите започнаха да се възстановяват (**Фиг. 23**).



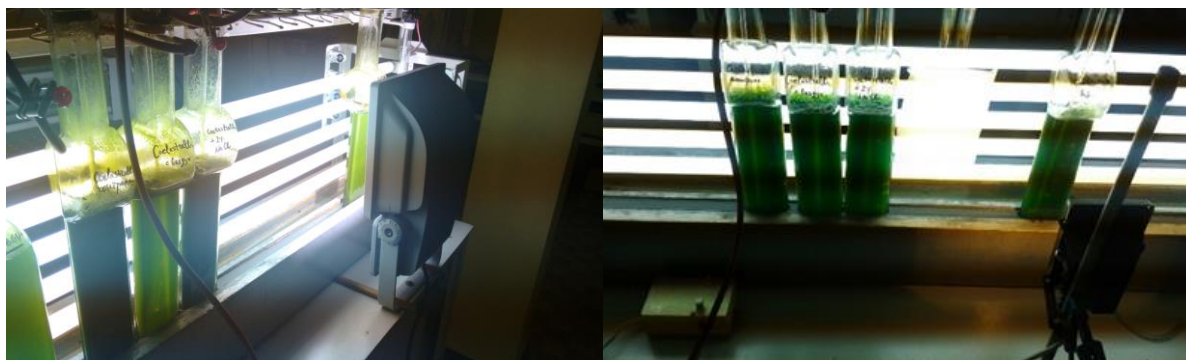
Фиг. 23. *Coelastrella* sp. BGV култивирана при температури 40, 42 и 44°C в края на опита (вляво) и след 20 дни при екстензивни условия (вдясно).

5.4.3. Индукция на каротеноидна синтеза при *Coelastrella* sp. BGV

Натрупването на каротеноиди (в т.ч. астаксантин) във водорасловите клетки се стимулира в условията на стрес, респективно при забавяне и спиране на растежа.

Установено е, че оксидативният стрес, предизвикан от силно осветление играе решаваща роля при синтеза на астаксантин (Salguero et al. 2003). Приема се, че засиленият синтез на каротеноиди е част от клетъчната стратегия, насочена към защита на клетката от оксидативни повреди (Ip & Chen 2005). Доказано е, че качеството на светлината е по-важно от количеството ѝ (Kim et al. 2006). Така например импулсната светлина повишава скоростта на производство на астаксантин при *Haematococcus pluvialis* поне 4 пъти в сравнение с тази при непрекъснато осветяване (Fábregas et al. 2001). Ефектът от осветяването зависи от плътността на културата, зрелостта на клетките (флагелатните стадии са много по-чувствителни от палмеловидните) и пътя на разпределение на светлината (Wang et al. 2003).

За нашите изследвания използвахме три вида стресово въздействие – отсъствие на CO₂, добавяне на 2% NaCl в хранителната среда (използваната хранителна среда е ½ ChR) и висока светлинна интензивност (35 000 Lx). Опитите са проведени на блок за интензивно култивиране в култивационни съдове с обем 200 ml при продължение на 240 часа. За контролата е използвана среда ½ ChR и осветление при 8 000 Lx.



Фиг. 24. Култура на *Coelastrella* sp. BGV в 0 час (ляво) и 240 часа (дясно) при едновременно въздействие на два стресови фактора

От получените данни за растежа на *Coelastrella* sp. BGV при различните варианти на стресово, най-добър растеж е установен при високата светлинна интензивност, за разлика от варианта с култивиране в отсъствието на CO₂, където растежът е минимален. Контролата и вариантът с 2% NaCl са с изравнени скорости на растеж.

Високата продуктивност на *Coelastrella* sp. BGV при висока светлинна интензивност е указание за перспективността на щама за нуждите на откритото култивиране, където дневните и сезонни светлинни условия варират в много широки граници.

От получените данни за биохимичния състав на *Coelastrella* sp. BGV при различните варианти на стресово въздействие, най-високо въглехидратно съдържание е установено при високата светлинна интензивност. При варианта с култивиране в отсъствието на CO₂ протеиновото съдържание е най-високо. Липидното съдържание е с минимални отклонения при трите опитни варианта и контролата. Най-високо каротеноидно съдържание е установено при вариата с 2% NaCl.

Интересни са резултатите от микроскопското наблюдение на културите в края на опита. Клетките в контролата запазват доброто си състояние и висока степен на синхронност (около 80%). При варианта без CO₂ всички зрели клетки са в аглутинати по 30 – 40 бр., докато автоспорите са свободни. При културата с NaCl освен силната аглутинация се налюдава задържане на деленето, лошо състояние (силно гранулирано съдържимо) на около 40% и отмиране на около 10% от клетките. При 35 000 Lx културата запазва добро състояние, с висока степен на синхронност (около 80%) и на практика не се различава от контролата.

Въз основа на получените резултати, описани по-горе, проведехме опит за комбинирано стресово въздействие. Използвана е същата опитна постановка (фиг. 24), като е приложено едновременно въздействие на 2 фактора – култивиране без CO₂ при висока светлинна интензивност (8000 Lx + 35 000 Lx) и култивиране в хранителната среда (използваната хранителна среда отново е ½ ChR) с 2% NaCl при висока светлинна интензивност (8000 Lx + 35 000 Lx). Контролата е при осветеност 8000 Lx + 35 000 Lx, ½ ChR среда и при 25°C. Целта е постигане на високо съдържание на каротеноиди в биомасата.



Фиг. 25. *Coelastrella* sp. BGV култури, отглеждани в условия на комбиниран стрес - 0 час (ляво) и 192 часа (дясно).

Скоростта на растеж при варианта с висока светлинна интензивност и 2% NaCl е почти 2 пъти по-висока в сравнение с контролата. Микроскопски се наблюдават червени клетки, което е указание за възможното натрупване на астаксантин.

По отношение съдържанието на основните клетъчни метаболити, използването като стресов фактор само на висока светлинна интензивност (контролата) потвърждава резултатите от предното изследване изследване по отношение преимущесвеното натрупване на въглехидрати в *Coelastrella* sp. BGV. При този вариант каротеноидното съдържание е 2 пъти по-високо, в сравнение с останалите варианти, но значително по-ниско в сравнение с използването само на 2% NaCl и нормална интензивност на

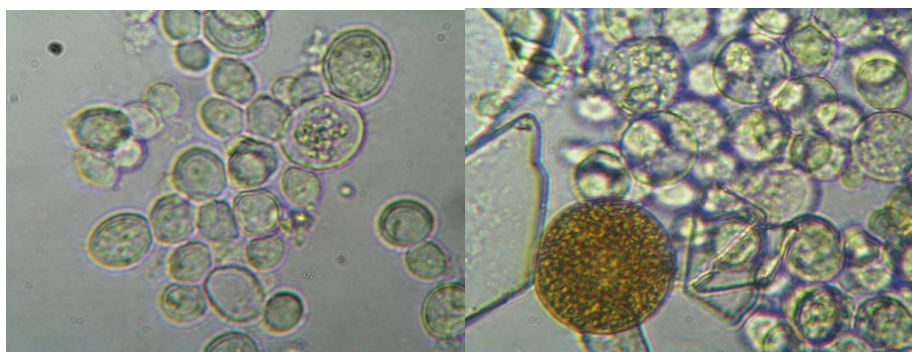
светлината. И при този опит най-високо е белтъчното съдържание е измерено при варианта без въглероден диоксид.

Като цяло високата светлинна интензивност повлиява върху мастнокиселинния състав. Съотношението на отделните мастни киселини се различава както в сравнение отглеждането при 8 000 Lx, така и по отношение на подаване на CO₂ и без подаване на CO₂. Добавянето на 2% NaCl в хранителната среда не променя значително процентното съдържание на мастните киселини спрямо контролната проба при 35 000 lx. Въпреки това мастнокиселинният състав се различава количествено от този при отглеждане на по-ниска светлинна интензивност при същата температура.

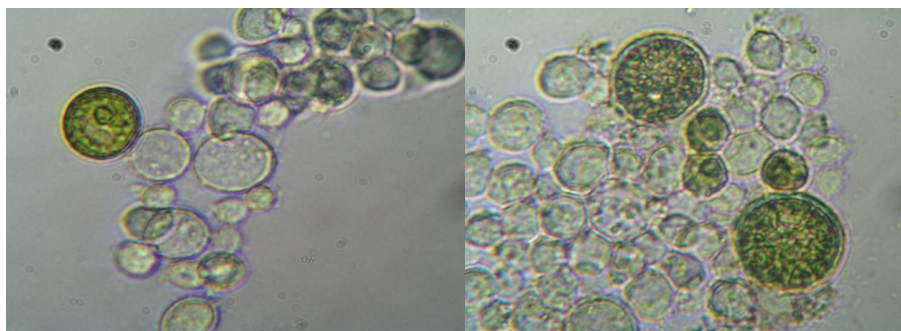
Съдържанието на миристинова киселина при отглеждане при по-висока светлинна интензивност е сравнително по-ниско от отглеждането при 8 000 Lx. При отглеждане при висока светлинна интензивност без подаване на CO₂ се наблюдава увеличение на палмитиновата киселина, която достига до стойности от 53%, а линоловата и гама-линоленова киселини намаляват почти двойно.

На този етап, макар и да постигнахме конкретни резултати за възможности за увеличаване на каротеноидното съдържание в биомасата на *Coelastrella* sp. BGV считаме, че те не са достатъчни. Предстоят експерименти с импулсна светлина с висока интензивност, както и използването на светлини с различна дължина на вълната.

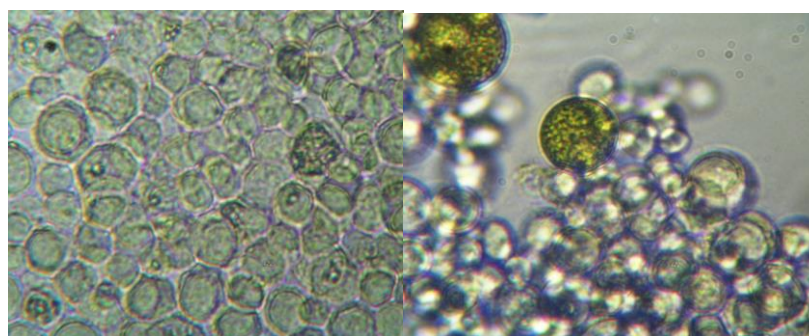
4.4.4. Микроскопско наблюдение на *Coelastrella* sp. BGV в края на опита на температурния блок-96 часа



Фиг. 26. Микроскопски снимки в края на опита при 40°C, А- 2 пъти 8000 Lx (HL вляво) и Б-8000 Lx (LL вдясно)



Фиг. 27. Микроскопски снимки в края на опита при 42°C, А- 2 пъти 8000 Lx (HL вляво) и Б-8000 Lx (LL вдясно)



Фиг. 28. Микроскопски снимки в края на опита при 44°C, А-2 пъти 8000 Lx (HL вляво) и Б-8000 Lx (LL вдясно)

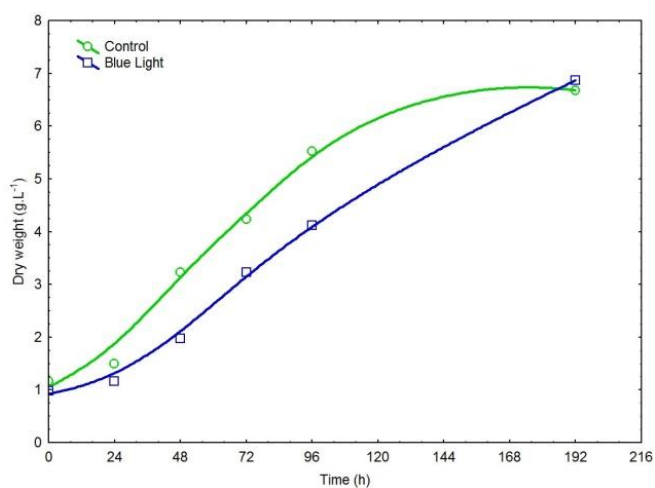
5.4.5. Каротеноидна индукция с използване на синьо LED осветление

През последните години LED осветлението се прилага като ефективен и евтин светлинен източник в процеса на култивиране на микроводорасли. Ето защо проведохме и експеримент с използване на синьо LED осветление (**Фиг. 29**). Контролата е при стандартно осветяване (8000 Lx). Култивирането на водораслите е извършено в продължение на 192 часа. Използваната хранителна среда е $\frac{1}{2}$ ChR.

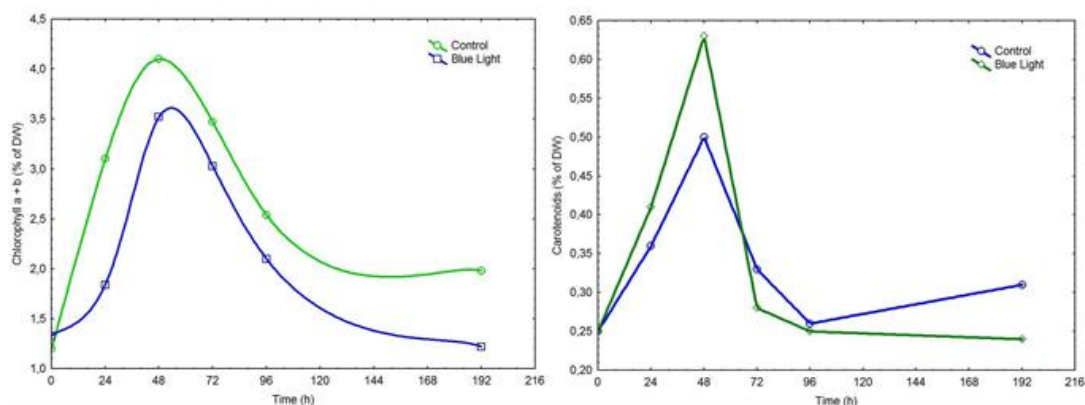


Фиг. 29. Установа за култивиране на *Coelastrella* sp. BGV при синьо LED осветяване

Растежът на *Coelastrella* sp. BGV не се повлиява значително при използване на различен светлинен източник (**Фиг. 30**). В края на култивационния период (192 часа) натрупаното количество биомаса в опитния вариант се изравнява с контролния, съответно 6,9 и 6,7 g/l



Фиг. 30. Растеж на *Coelastrella* sp. BGV при нормално (control) и синьо LED осветяване (blue light).



Фиг. 31. Съдържание на хлорофили (ляво) и каротеноиди (дясно) като % от сухото тегло в клетките на *Coelastrella* sp. BGV.

От всички проведени експерименти за индукция на каротеноидна синтеза най-високо каротеноидно съдържание (0,63% от АСВ) беше постигнато на 48-мия час от излагане на културата на синьо LED осветяване (**Фиг. 31**).

Получените от нас резултати до голяма степен се доближават до резултатите на малкото изследователи, работили по установяване на биохимичния състав и условията за култивиране на щамове от видове и разновидности от род *Coelastrella*. Тази сравнимост например се отнася до общото количество каротеноиди спрямо данните на Abe et al. (2004, 2007) и до липидите и техния състав на Abe et al. (2007), Luo et al. (2016), Karpagam et al. (2018). В нашите експерименти получените количества протеини, пигменти и липиди са относително по-високи и това прави много перспективно използването на щам в битехнологични производства. Определянето с помощта на 18S РНК е сходно с това на Suriya et al. (2018), които също стигат със сигурност само до родово ниво.

5. ИЗВОДИ

Изследвани са скоростта на растеж, продуктивността и биохимичния състав на изолирания от нас нов щам *Coelastrella* sp. BGV. Въз основа на получените резултати може да се даде следната кратка характеристика на щама:

Най-продължителна линейна фаза на растеж и максимална плътност на водорасловата култура се достигат при използване на средата на Šetlik (1967), модифицирана от Георгиев и др., 1978 г. (ChR среда), която е и с най-високо солево съдържание. Устойчивостта и добрият растеж на щама при повишена концентрация на минералните елементи в хранителната среда е определено технологично предимство за масовото култивиране на открито, особено при използване на технологията за култивиране на тънък слой и при повишена плътност на водорасловата суспензия. Съдържанието на каротеноиди е почти 2 пъти по-високо и достигат 0,3 mg/g биомаса при варианта със средата на Šetlik (1967), модифицирана от Георгиев и др., 1978 г.

Температурният оптимум на *Coelastrella* sp. BGV е при 35°C, като щамът запазва висока продуктивност в широк температурен диапазон – от 25 до 35°C при 2 пъти 8000 Lx осветеност и не загива при продължително култивиране на 40, 42 и 44°C. Това говори за големите му адаптивни възможности и пригодността му за култивиране на открито, където дневните и сезонни флуктуации на температурата са значителни.

Съдържанието на основни клетъчни метаболити – белтък, въглехидрати, липиди и пигменти е в стандартните граници за вида.

Биотехнологичните отнасяния (отсъствие на лепливост и склонност за аглутинация), подходящият биохимичен състав на биомасата, широкият температурен диапазон на растеж, устойчивостта към високи температури и висока светлинна интензивност, правят *Coelastrella* sp. BGV твърде интересна и перспективна, както за експериментална лабораторна работа, така и за широкомащабно култивиране.

6. ПРИНОСИ

1. Изолиран е нов български шам зелено микроводорасло *Coelastrella* sp. BGV, който се поддържа в сбирката на секция Експериментална алгология на ИФРГ – БАН. Принадлежността към род *Coelastrella* е установена на базата на морфологични (светлинна и сканираща микроскопия) и молекулярно-генетични характеристики на щама.
2. Проучени и сравнени са възможностите за култивиране на *Coelastrella* sp. BGV в три различни среди и е установено, че средата на Šetlik, модифицирана от Георгиев и др., при двукратно намаляване на солите в нея, е най-подходяща за растеж и развитие на водораслото.
3. Определени са границите на температурна толерантност на *Coelastrella* sp. BGV в диапазона 20-44°C, при две нива на осветяване.
4. Доказана е пластичността на щама и бързото възстановяване на културата след стресови условия при температури 40, 42 и 44°C при едностранно и двустранно осветяване.
5. Установени са промените в биохимичния състав (белтъци, въглехидрати, липиди, мастни киселини и пигменти) на *Coelastrella* sp. BGV в зависимост от култивационната температура при две нива на осветяване, както и в условия на комбиниран стрес.
6. Проучени и сравнени са възможностите за индукция на каротеноидна синтеза в *Coelastrella* sp. BGV. При въздействие със стресови фактори, комбинация от тях или използване на синьо LED осветяване е установено, че най-високо каротеноидно съдържание (0,63% от АСВ) се постига при прилагане на синьо LED осветяване.
7. Установено е, че *Coelastrella* sp. BGV е изключително добър и перспективен продуцент на каротеноиди.
8. Придобитите познания за *Coelastrella* sp. BGV са полезни и приложими в бъдещи биотехнологични разработки.

Публикации свързани с дисертацията и излезли от печат:

1. Dimitrova P., G. Marinova, P. Pilarski. 2016. Preliminary studies on the growth and biochemical composition of a promising carotenoid producing strain *Coelastrella* sp. Science & Technologies, VI (3): Natural and Mathematical Science: 71–78.

2. Dimitrova P., G. Marinova, S. Alexandrov, I. Iliev, P. Pilarski. 2017. Biochemical characteristics of a newly isolated strain *Coelastrella* sp. BGV cultivated at different temperatures and light intensities. Годишника на СУ „Св. Климент Охридски“.

3. Dimitrova P. H., M. P. Stoyneva-Gärtner, B. A. Uzunov & G. Gärtner 2018. Review of the algological studies of Bulgarian Black Sea coastal water bodies (1890-2017) with special attention to the newly described and threatened species. - In: Peev D. R., G. Gärtner, M. P. Stoyneva-Gärtner, N. V. Popova & E. E. Georgieva (Eds), Proceedings of the First European Symposium “Research, Conservation and Management of Biodiversity of European Seashores” (RCMBES) Primorsko, Bulgaria, 8-12 May 2017. Acta zoologica bulgarica, Suppl. 11: 27–42. IF=0,413

Участие в международни научни конференции:

1. Младежка научна конференция „Климентови дни“, 19 -20 ноември 2015 г., гр. София, България.

2. Международна научна конференция, посветена на IV години от създаването на Съюз на учените – Стара Загора, 02 - 03 юни 2016 г., гр. Стара Загора, България.

3. Младежка научна конференция „Климентови дни“, 17 - 18 ноември, 2016 г., гр. София, България.

4. III Международна конференция „Храни“, 23-25 март 2017 г., Нов Български Университет

Постерни съобщения:

1. Dimitrova P., Marinova G., Alexandrov S., Iliev I., Pilarski P. Biochemical characteristics of a newly isolated strain *Coelastrella* sp. BGV cultivated at different temperatures and light intensities. Младежка научна конференция „Климентови дни“, 19 -20 ноември 2015 г., гр. София, България.

2. Dimitrova P., G. Marinova, P. Pilarski. 2016. Preliminary studies on the growth and biochemical composition of a promising carotenoid producing strain *Coelastrella* sp. XXVI Международна научна конференция, посветена на LV години от създаването на Съюз на учените – Стара Загора, 02 - 03 юни 2016 г., гр. Стара Загора, България.

3. Dimitrova P., G. Marinova, S. Alexandrov, I. Iliev, P. Pilarski. 2016. Biochemical characteristics of a newly isolated strain *Coelastrella* sp. BGV cultivated at different temperatures and light intensities. Младежка научна конференция „Климентови дни“, 17 - 18 ноември, 2016 г., гр. София, България.

4. Dimitrova P., G. Marinova, T. Toshkova, S. Alexandrov, P. Pilarski. 2017. A brief look at the biotechnological potential of a local microalgal strain *Coelastrella* sp. Food-3 International Conference “The challenges for quality and safety along the food chain”, 23 – 25th March, 2017, NBU, Sofia, Bulgaria.

Участие в проекти

Като ръководител :

1. „Нови щамове микроводорасли за нуждите на производственото култивиране в България”, договор № ДФНП - 206/16.05.2016, сключен с Българската Академия на Науките по Програма за подпомагане на младите учени в БАН. Ръководител на проекта: **ас. Петя Димитрова.** Период: 20.05. 2016 – 19.07. 2017г.

Като участник:

2. „Цианопрокариоти – нов потенциален рисков фактор за злокачествени заболявания в България?” - ДН13 / 9- Ръководител на проекта проф. д.б.н. Майя Стойнева-Гертнер. Период: 2017 - 2020 г. Финансираща организация ФНИ-МОН

3. „Определяне на потенциално токсични прокариотни водорасли в български термални водоеми” - 80-10-185/26.04.2018. Ръководител на проекта проф. д.б.н. Майя Стойнева-Гертнер. Период: 2018- 2019 г. Финансираща организация ФНИ на СУ „Св. Климент Охридски“.

7. БЛАГОДАРНОСТИ

Благодаря специално на научния ми консултант доц. д-р Пламен Пиларски и на гл. ас. д-р Гергана Маринова за всичко, на което ме научиха и за помощта им при изготвянето на дисертацията ми. А също и на всички колеги от направление „Експериментална алгология“, към ИФРГ-БАН, за ценните съвети и подкрепа.

Благодаря на ръководството на ИФРГ-БАН за осигурените условия за провеждането на научните ми експерименти и за оказаната помощ през годините.

Благодаря на колегите от Чехия, които направиха сканиращите електронни снимки на *Coelastrella*.

Благодаря на колегите ми от АБИ- проф. Иван Атанасов и гл. ас. д-р Маряна Радкова, които ми помогнаха за извършването на молекулярно-генетичния анализ и за изготвянето на филогенетичното дърво.

Благодаря на проф. д.б.н. Майя Стойнева-Гертнер, доц. д-р Благой Узунов от СУ „Св. Климент Охридски“ и на проф. д.б.н. Георг Гертнер за помощта при определянето на водорасловия щам и за подкрепата.

Благодаря за осигуреното финансиране на проектите:

1. *„Нови щамове микроводорасли за нуждите на производственото култивиране в България”*, договор № ДФНП - 206/16.05.2016г. Финансираща организация БАН
2. *„Цианопрокариоти – нов потенциален рисков фактор за злокачествени заболявания в България?”* - ДН13 / 9 2017-2020г. Финансираща организация ФНИ-МОН
3. *„Определяне на потенциално токсични прокариотни водорасли в български термални водоеми”* - 80-10-185/26.04.2018. Финансираща организация ФНИ-СУ

Чрез, което беше възможно изпълнението на описаните изследвания.

Благодарна съм, също, че съм възпитаничка на Биологически факултет към СУ „Св. Климент Охридски“ и съм свързана с него не само като студент, а и като преподавател.

И не на последно място искам да благодаря на семейството си, за разбирането и подкрепата. И най-вече на дъщеря ми Иванина, на която посвещавам този дисертационен труд.