

ИВАНИНА АНГЕЛОВА ВАСИЛЕВА

**Физиолого - биохимични характеристики и биотехнологичен потенциал на  
българските водораслови шамове  
*Scenedesmus* sp. BGP и *Chlorella vulgaris* R-06/2**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертация

за получаване на научната и образователна степен

“ДОКТОР”

Научна специалност  
01 - 06 - 10 Биохимия

Научен консултант: проф. д-р Лиляна Гилова

Рецензенти: проф. д-р Катя Георгиева  
доц. д-р Ганка Чанева

---

София, 2019

*Сърдечно благодаря на научния си консултант проф. Лиляна Гигова, че извървя с мен неравния и дълъг път по изготвянето на дисертационния ми труд. Не мога да изразя с думи търпението, човешкото отношение и професионализма, които срещнах в нейно лице.*

*Благодаря на проф. Георги Петков, д-р Юлиана Иванова, д-р Гургана Маринова, докторант Таня Тошкова-Йотова, както и на всички колеги от Лаборатория „Експериментална Алгология“, за споделения научен опит и за това, че ме научиха на многопластността на добрите колегиални взаимоотношения.*

*Изказвам своята признателност към предходното и настоящото ръководство на Института, както и на всички колеги, от които съм получила подкрепа, съдействие и незаменими научни съвети. Без вас това нямаше да е място, което да чувствам като дом.*

*Дължа специална благодарност на проф. Снежанка Дончева. За това, че повярва в мен, когато имах най-голяма нужда.*

*Благодаря на семейството и близките ми, че са до мен и ми прощават всички грешки, че ме научиха кои са важните неща в живота и за какво си струва да се боря. Благодаря на приятелите ми за това, че вярват в мен.*

*Част от настоящите изследвания бяха извършени с финансовата подкрепа на Програмата за подпомагане на Млади учени в БАН по проект „Физиолого-биохимично характеризирание на новоизолирания български микроводраслов щам *Scenedesmus* sp. BGP с цел оценка на биотехнологичния му потенциал“, договор № ДФНП - 207/16.05.2016г.*

ИВАНИНА АНГЕЛОВА ВАСИЛЕВА

**Физиолого - биохимични характеристики и биотехнологичен потенциал на  
българските водораслови щамове  
*Scenedesmus* sp. BGP и *Chlorella vulgaris* R-06/2**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертация

за присъждане на научната и образователна степен

“ДОКТОР”

Научна специалност  
01 - 06 - 10 Биохимия

Научен консултант: проф. д-р Лиляна Гилова

Рецензенти: проф. д-р Катя Георгиева  
доц. д-р Ганка Чанева

---

София, 2019

Дисертацията е написана на 159 печатни страници и е онагледена с 40 фигури, 10 таблици и 3 снимки. Списъкът на цитираната литература включва 435 източника, от които 4 на кирилица.

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

Вътрешни членове:

1. Проф. д-р Лиляна Гилова
2. Проф. д-р Катя Георгиева

Външни членове:

1. Проф. д-р Венета Капчина - Тотева
2. Доц. д-р Ганка Чанева
3. Доц. д-р Детелина Белкинова

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

### Използвани съкращения

$\mu$  - специфична скорост на растеж  
АСВ - Абсолютно сухо вещество  
АКФ – Активни кислородни форми  
АТФ – Аденозин трифосфат  
ВСИ - Висока светлинна интензивност ( $2 \times 10^{12} \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )  
ДНК - Дезоксирибонуклеинова киселина  
НСИ - Ниска светлинна интензивност ( $10^{12} \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )  
ААТ – Аспартат аминотрансфераза  
AN – Амониев нитрат  
САТ – Каталаза  
EDTA – Етилен диамин тетраоцетна киселина  
GDH - Глутамат дехидрогеназа  
GOGAT- Глутамат синтаза  
GR - Глутатион редуктаза  
GS - Глутамин синтаза  
IOD - Интегрирана оптична плътност  
MDH - Малат дехидрогеназа  
N - Азот  
NAD – Никотинамид аденин динуклеотид  
NADP – Никотинамид аденин динуклеотид фосфат  
PAGE - Електрофореза в полиакриламиден гел  
SDS - Натриев додецилсулфат  
SOD - Супероксид дисмутаза  
Tris – трис(хидроксиметил)аминометан  
U – Карбамид

## УВОД

Микроводораслите са голяма и разнообразна група от аеробни фотосинтезиращи микроорганизми, разпространени в най-разнообразни местообитания. Въпреки че са събирани и използвани за храна от векове, едва през последните десетилетия те се култивират и преоткриват като богат източник на ценни вещества, дължащо се на нарастващата потребност от естествени, безопасни, екологично чисти и възобновяеми продукти. Микроводорасловата биомаса и нейни компоненти имат огромно потенциално, но и все по-нарастващо реално приложение в селското стопанство, екологията, хранителната индустрия, аквакултурите, фармацевцията и козметиката. Ценни микроводораслови метаболити са белтъците, съдържащи незаменимите аминокиселини, ненаситените мастни киселини, стеролите, витамините, пигментите, полизахаридите и др. Много от тези вещества проявяват различни биологични активности и фармакологични свойства, като антибактериална, противогъбична, антивирусна и антитуморна активност, имуностимулиращи, противовъзпалителни, фибринолитични, антидиабетни и антиоксидантни свойства и се използват или имат потенциал за приложение като лекарствени средства. Някои микроводорасли произвеждат метаболити, които имат много добро поглъщане на UV радиация (спорополенин, сцитонемин и микоспорин-подобни аминокиселини), което е от изключително значение за разработката на нови природни средства за защита от вредните слънчеви лъчи.

Все по-нарастващите сфери на приложение обуславят интереса към увеличаване продукцията на водораслова биомаса и полезните ѝ компоненти, което е стимул за непрекъснато подобряване на водорасловата биотехнология. Успехът на водорасловата биотехнология е тясно свързан с избора на правилния щам с необходимите качества, както и специфичните условия на култивиране за получаване на желаните продукти. Култивационните условия (температура, осветеност, начална плътност и др.) за постигане на оптимален растеж са различни за всеки щам. От редица изследователи е установено, че промяната на физичните и химични фактори на средата повлиява щамово-специфично не само растежа, но и качествения състав и количеството на органичните съединения в клетките. Това прави необходимо целенасоченото проучване на всеки новоизолиран щам с цел определяне на физиолого-биохимичните му особености и биотехнологичните му възможности. Изолирането и изследването на нови български водораслови щамове е важно от гледна точка на откриването на местни, конкурентноспособни, бързо растящи и високопродуктивни щамове.

Въпреки несъмнените постижения в областта на експерименталната и приложна алгология, малка част от огромното биоразнообразие на микроводораслите е изследвана, а потенциалът на този богат биоресурс далеч не е опознат и използван.

Всичко това показва актуалността на проблематиката на настоящия дисертационен труд и перспективността на изучаването и използването на нови български щамове.

## ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на изследванията е да се направи оценка на биотехнологичния потенциал на новия български щам *Scenedesmus* sp. BGP и на българския щам *Chlorella vulgaris* R-06/2 посредством физиолого-биохимичното им характеризиране.

За постигането на тази цел си поставихме следните задачи:

1. Да се изследва влиянието на култивационната температура при две нива

на осветяване върху растежа, биохимичния състав и активността на избрани антиоксидантни ензими на *Scenedesmus* sp. BGP.

2. Да се изследва влиянието на началната плътност на културата върху продуктивността на биомаса на *Scenedesmus* sp. BGP.

3. Да се изследва промяната в растежа и биохимичния състав под влияние на концентрацията на хранителната среда и вида на азотния източник при *Scenedesmus* sp. BGP и вида на азотния източник при *Chlorella vulgaris* R-06/2.

4. Да се изследва влиянието на вида на азотния източник в хранителната среда върху изоензимния профил и активността на метаболитни и антиоксидантни ензими, протеази и естерази на *Scenedesmus* sp. BGP и *Chlorella vulgaris* R-06/2.

5. Да се анализира биотехнологичната перспективност на *Scenedesmus* sp. BGP и на *Chlorella vulgaris* R-06/2.

*Chlorella vulgaris* R-06/2 е български щам, охарактеризиран по отношение на растеж, продуктивност и състав на биомасата при различни температури (в областта 26-44°C) при 2 нива на осветяване и при промяна на концентрацията на минералните елементи в хранителната среда от колегите Гъчева и Пиларски. Статията им е публикувана през 2008 г. (Gacheva and Pilarski, 2008). Наред със *Scenedesmus* sp. BGP, в настоящите изследвания вниманието е насочено и към продължаване и задълбочаване на характеризирането на *Chlorella vulgaris* R-06/2. Сравнителният характер на изследванията в така поставените задачи би допринесъл за по-пълно физиолого-биохимично характеризиране и оценяване на биотехнологичния потенциал на двата български щама зелени водорасли.

## МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

### 1. Произход на водораслите

*Scenedesmus* sp. щам BGP и *Chlorella vulgaris* щам R-06/2 са зелени микроводорасли изолирани от учени от направление “Експериментална алгология” към ИФРГ – БАН. *Scenedesmus* sp. BGP е изолиран от локва с дъждовна вода (20°C) в София през 2013 г., а *Chlorella vulgaris* R-06/2 от геотермално поточе (42°C) в Рупите през 2008 г. Двата щам се съхраняват в колекцията на направление “Експериментална алгология” към ИФРГ – БАН.

### 2. Поддържане и лабораторно култивиране на водораслите

Поддържането на опитните щамове и култивирането на водораслите се извършва на следните съоръжения, конструирани в Институт по физиология на растения и генетика – направление “Експериментална алгология”:

1. Луминистат – използва се за съхранение и поддържане на опитните щамове в течна хранителна среда при постоянна температура от 20°C и  $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

2. Блок за интензивно култивиране – използва се за култивиране на водораслите при интензивни условия – предварително зададена температура и едностранно осветяване ( $132 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), продухване с въздух, обогатен с 2% въглероден диоксид. Култивирането се провежда в съдове с работен обем 190 mL.

3. Блок с температурен градиент – използва се за интензивно култивиране на водорасли в условия на температурен градиент – от 16 до 44°C, с едностранно ( $132 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) и двустранно осветяване ( $2 \times 132 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) и продухване с въздух, обогатен с 2% въглероден диоксид. Култивирането се провежда в съдове с

работен обем 80 mL.

За ежедневен микроскопски контрол на биологичното състояние на културите се използва микроскоп NU 2 – Karl Zeiss – Jena при увеличение до 780×.

Култивирането на водораслите се извършва в стерилна хранителна среда, съдържаща всички необходими за растеж макро- и микроелементи.

В част от експериментите, водораслите се култивират в хранителната среда на Setlik (1967), модифицирана от Георгиев и сътр. (1978), разрежена до ¼ от оригиналната концентрация, която рутинно се използва в лабораторията по Експериментална алгология за отглеждане на зелени водорасли и е възприето да се нарича “стандартна среда”. Азотните източници в тази среда са карбамид и амониев нитрат и в текста на дисертацията тя се описва като “среда с два азотни източника”, “среда с карбамид+амониев нитрат” и “U+AN”. За изследване на ефекта от промяната на азотния източник и концентрацията на солите, на базата на стандартната среда се изготвят следните варианти:

– 2 среди с различен азотен източник, но с еднакво количество азот (20 mM) – в едната от тях азотният източник е само карбамид (среда с карбамид, U), а в другата само амониев нитрат (среда с амониев нитрат, AN). Съставът и концентрацията на всички останали компоненти се запазва.

– среда несъдържаща азот (среда без азотен източник, -N), като съставът и концентрацията на всички останали компоненти са както в средите U+AN, U и AN.

– 1 среда с по-ниска (½x) и 3 среди с по-висока (2x, 4x и 8x) концентрация на всички компоненти от концентрацията им в средата U+AN.

Съставът и концентрацията на солите в използваните стандартна среда и базираните на нея варианти са представени в Таблица 1.

**Таблица 1.** Състав и концентрация на солите в хранителните среди за отглеждане на *Scenedesmus* sp. BGP и *Chlorella vulgaris* R-06/2.

№	Елементи	-N [mg L <sup>-1</sup> ]	U [mg L <sup>-1</sup> ]	AN [mg L <sup>-1</sup> ]	½ U+AN [mg L <sup>-1</sup> ]	U + AN [mg L <sup>-1</sup> ]	2 U+AN [mg L <sup>-1</sup> ]	4 U+AN [mg L <sup>-1</sup> ]	8 U+AN [mg L <sup>-1</sup> ]
1	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	-	-	800	200	400	800	1600	3200
2	CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	-	600	-	150	300	600	1200	2400
3	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	170	170	85	170	340	680	1360
4	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	494	494	494	247	494	988	1976	3952
5	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	5.478	5.478	5.478	2.74	5.478	10.956	21.912	43.824
6	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.545	1.545	1.545	0.773	1.545	3.09	6.18	12.36
7	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.623	0.623	0.623	0.312	0.623	1.246	2.492	4.984
8	Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	7.025	7.025	7.025	3.513	7.025	14.05	28.1	56.2
9	MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.558	0.558	0.558	0.28	0.558	1.116	2.232	4.464
10	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.718	0.718	0.718	0.359	0.718	1.436	2.872	5.744
11	CoSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.703	0.703	0.703	0.352	0.703	1.406	2.812	5.624
12	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.605	0.605	0.605	0.303	0.605	1.21	2.42	4.84
13	NaHCO <sub>3</sub>	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000

### 3. Аналитични методи

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

Специфичната скорост на растеж [μ] се изчислява по формулата:

$$\mu = \frac{\ln(m_{t_2}/m_{t_1})}{t_2 - t_1}$$

(Levasseur et al., 1993), където  $m_{t_1}$  е АСВ в началото на култивационния период ( $t_1$ ) - (0 ден) и  $m_{t_2}$  е АСВ в определен ден ( $t_2$ ) от експоненциалния растеж на културата ( $t_2 - t_1 > 1$ ).

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

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

Въглехидратното съдържание е определяно по фенол-серния метод на Dubois et al. (1956).

Съдържанието на общи липиди е определяно чрез екстрахиране с горещ етанол, по метод описан от Петков и Дилов (1987).

#### 4. Изолиране и анализ на разтворимите клетъчни белтъци

##### 4.1. Изолиране на разтворимите клетъчни белтъци и определяне на концентрацията им

Утаени чрез центрофугиране (5500×g, 15 мин.) водораслови клетки се суспендират в 60 mM TE буфер (Tris base с 0.1 mM ЕДТА, pH 7) и се дезинтегрират механично 2-3 пъти за по 15 мин., при 0°C. Клетъчният хомогенат се центрофугира за 15 мин. при 13000×g и разтворимите клетъчни белтъци в супернатанта се използват за последващите анализи. Концентрацията на белтъците ( $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ ) се определя по колориметричния метод на Bradford (1976) с албумин като стандарт.

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

Равни количества разтворими белтъци от клетки, култивирани при изследваните експериментални условия, се подлагат на непрекъсната PAGE при неденатуриращи и нередуциращи условия, както е описано от Laemmli (1970), но в отсъствие на SDS. Електрофоретичното разделяне на белтъците се извършва в 8% или 10% гелове, за около 3 часа при 100 V. След електрофореза, гелове с разделените белтъци се оцветяват за анализ на следните ензими:

4.2.1. *Глутамин синтетаза (GS, EC 6.3.1.2)* - активността в гел (8%) е онагледена по метода на Simonović et al. (2004);

4.2.2. *Глутамат синтаза (GOGAT, EC 1.4.1.13)* - използва се метода на Matoh et al. (1980);

4.2.3. *Глутамат дехидрогеназа (GDH,  $\text{NAD}^+$  - EC 1.4.1.4;  $\text{NADP}^+$  - EC 1.4.1.2)* - изследването на активностите на този ензим със всеки от двата кофактора се извършва по методиката на Nash & Davies (1975);

4.2.4. *Аспартат аминотрансфераза (AAT, EC 2.6.1.1)* - по метода на Griffith & Vance (1989);

4.2.5. *Малат дехидрогеназа (MDH,  $\text{NAD}^+$  - EC 1.1.1.37;  $\text{NADP}^+$  - EC 1.1.1.82)* - по метода на Honold et al. (1966);

4.2.6. *Супероксид дисмутаза (SOD, EC 1.15.1.1)* - изоформите се онагледяват, следвайки методиката на Azevedo et al. (1998);

4.2.7. *Каталаза (CAT, EC 1.11.1.6)* - в 8% гелове, по метода на Chandlee & Scanadlios (1983) или по методиката описана в персонално съобщение на Scandalios.



4.2.9. Глутатион редуктазна (GR, EC 1.6.4.2) - по метод, описан от Anderson et al. (1995).

Непосредствено след оцветяване, всеки гел се фотографира с помощта на UVItec гел-документираща система (Cambridge, UK) и се анализира с Gel-Pro32 Analyzer (Media Cybernetics Inc., Bethesda, MD USA) софтуер. Активността на всеки изоензим (ивица на гела) се измерва като интегрирана оптична плътност (IOD), в произволни единици. За ензим който има няколко изоформи, сумата от техните стойности за IOD се приема за относителна обща ензимна активност.

## 5. Достоверност на получените резултати и статистическа обработка

Култивирането се осъществява при стерилни условия на хранителните среди и култивационните съдове.

Всички опити се извършват в три повторения. Резултатите се представят като средни стойности и стандартни отклонения ( $\pm$ SD). Статистически значимата разлика между отделните третирания се установява чрез еднофакторен дисперсионен анализ (ANOVA) и Bonferroni's post hoc тест, използвайки GraphPAD InStat Software (San Diego, CA, USA). Стойностите, при които  $P < 0.05$  се считат за значими.

## РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

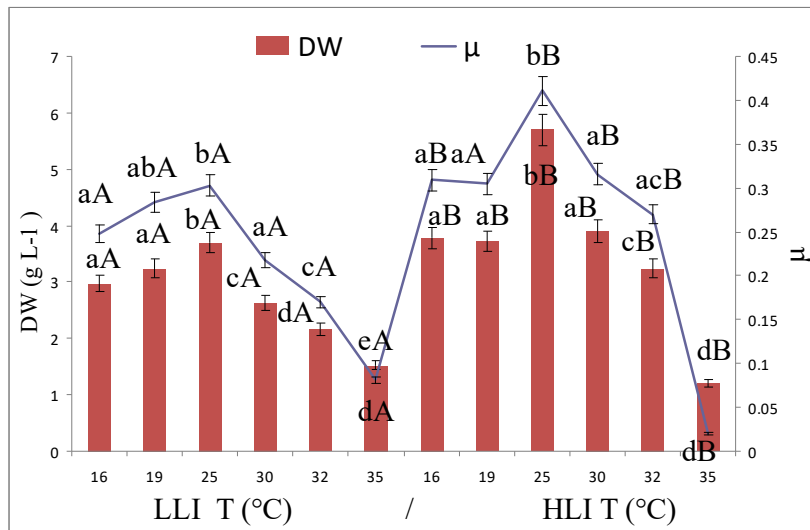
1. Влияние на култивационната температура и светлинната интензивност върху растежа, биохимичния състав, изоензимния профил и активността на антиоксидантни ензими на *Scenedesmus* sp. BGP

При проведените експерименти са проследени промените в растежа и количеството на основни биохимични компоненти на биомасата на *Scenedesmus* sp. BGP под комбинираното влияние на температурата и осветяването. Култивационните условия са следните: седем различни температури (16, 19, 25, 30, 32, 35 и 42°C); две светлинни интензивности -  $132 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , едностранно осветяване (НСИ) и  $2 \times 132 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , двустранно осветяване (ВСИ); хранителна среда на Setlik (1967), модифицирана от Георгиев и сътр. (1978), разрежена до  $\frac{1}{4}$  от оригиналната концентрация (стандартна среда). Културите са продухвани непрекъснато с въздух, обогатен с 2%  $\text{CO}_2$ . Култивирането е проведено за 96 часа при начална плътност на всички култури от  $1.1 \text{ g L}^{-1}$  АСВ.

1.1. Влияние на температурата и интензивността на светлината върху количеството биомаса и специфичната скорост на растеж на *Scenedesmus* sp. BGP

*Scenedesmus* sp. BGP расте добре в температурния диапазон 16–32°C и при двете светлинни интензивности (**Фигура 1**). Когато температурата е 35°C, това значително понижава скоростта на растеж и полученото количество биомаса е най-малко ( $P < 0.05$ ). Водораслото оцелява дори при 42°C, въпреки че на 48-мия час се наблюдава депигментация на културата. Поставена при 25°C, обезцветената култура постепенно придобива зелен цвят и АСВ започва да нараства, което показва, че поне част от клетките запазват своята жизнелост. Оптималната температура за растеж на *Scenedesmus* sp. BGP и при двете нива на осветяване е 25°C (**Фигура 1**). При тази температура се постигат най-висока специфична скорост на растеж и най-висок добив на биомаса на 96-ия час, които при едностранно осветяване са  $0.303 \pm 0.07$  и  $3.7 \pm 0.1 \text{ g L}^{-1}$ , съответно, а при двустранно осветяване са  $0.411 \pm 0.013$  и  $5.7 \pm 0.3 \text{ g L}^{-1}$ , съответно. В

температурния диапазон от 16-32°C, ВСИ значително стимулира растежа на *Scenedesmus* sp. BGP с 16 до 57% в сравнение с НСИ, като стимулацията е най-висока при оптималната температура (Фигура 1). Високата светлинна интензивност в комбинация с температури от 35 и 42°C са особено неблагоприятни условия за растеж на българския щам.



**Фигура 1.** Количество на биомасата (АСВ, g L<sup>-1</sup>) и специфична скорост на растеж [μ] на *Scenedesmus* sp. BGP на 96-ия час от култивирането му при различни температури и осветяване. LLI (НСИ), 132 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> едностранно осветяване; HLI (ВСИ), 2×132 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> двустранно осветяване. Средните стойности за АСВ и [μ] означени с различни малки букви се различават значително (P<0.05) между температурите за специфична интензивност на светлината. Различните главни букви показват значителна разлика (P<0.05) за специфична температура между НСИ и ВСИ.

В сравнение с други представители на рода, новият български щам показва диапазон на толерантност, леко изместен към по-ниски температури (16-32°C), както и по-ниска оптимална температура на растеж (25°C), което може да бъде свързано с температурните условия на естественото му местообитание (София, България, средни температури от 20°C за м. юли 2013). Установената висока скорост на растеж при всички приложени температури, с изключение на 35°C (Фигура 1) е указание за високата температурна толерантност на *Scenedesmus* sp. BGP.

### 1.2. Влияние на температурата и осветяването върху биохимичния състав на *Scenedesmus* sp. BGP

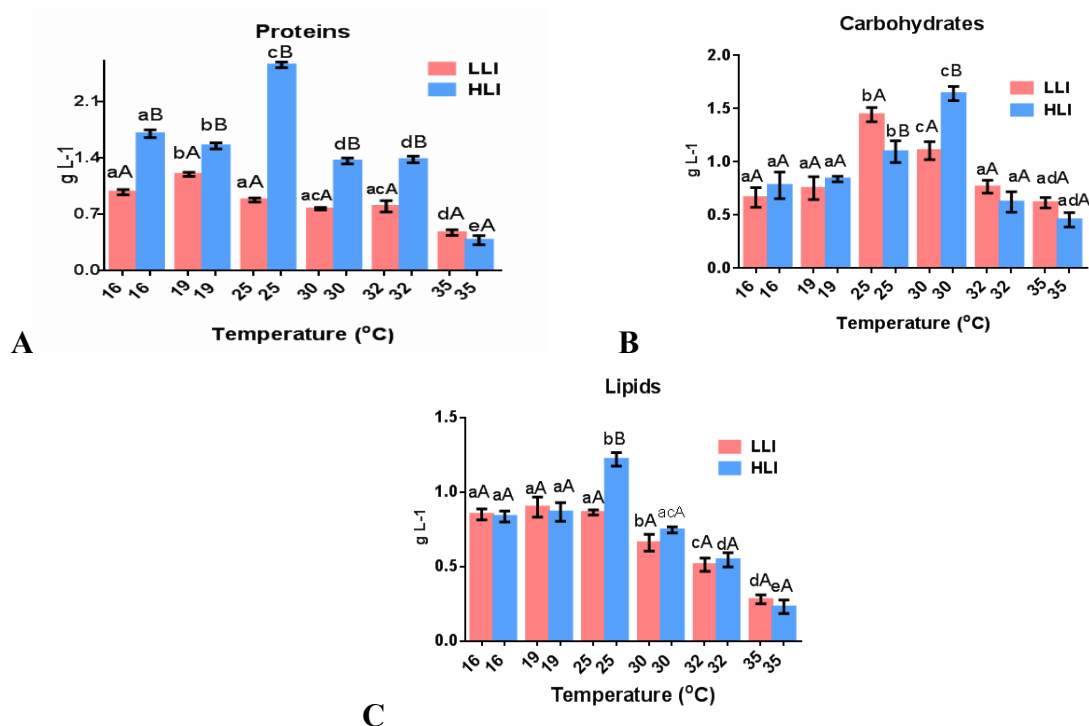
Промените в биохимичния профил на представители от р. *Scenedesmus* под влияние на различни температури или светлинни интензивности са изследвани и описани от редица автори (Li et al., 2011; Gris et al., 2014; Han et al., 2016; Toledo-Cervantes et al., 2018). Значително по-малко са изследванията върху комбинираното действие на тези два фактора (Tahiri et al., 2000; Sanchez et al., 2008).

При НСИ, субоптималните температури, особено 19°C (P<0.05) стимулират белтъчната синтеза, докато при 30 и 32°C количеството на белтъци е по-ниско от това при оптималната температура. При ВСИ, белтъчното съдържание в биомасата на *Scenedesmus* sp. BGP намалява (P<0.05) както при по-ниски, така и при по-високи от оптималната температура. Въпреки това, производството на белтъци е значително по-високо (с 73-189%) при ВСИ, отколкото при НСИ, с изключение на 35°C. Най-голямо

количество белтъци ( $2.54 \pm 0.12 \text{ g L}^{-1}$ ) шамът продуцира при  $25^\circ\text{C}$  и ВСИ (Фигура 2А).

Въглехидратите са друг ценен компонент на водорасловата биомаса. Количеството на този биохимичен компонент в биомасата на *Scenedesmus* sp. BGP се променя с промяна на температурата ( $16\text{--}32^\circ\text{C}$ ) в границите  $0.67\text{--}1.44 \text{ g L}^{-1}$  при НСИ и  $0.62\text{--}1.64 \text{ g L}^{-1}$  при ВСИ (Фигура 2В). При култивиране на водораслото при 16, 19 и  $32^\circ\text{C}$ , количеството на въглехидратите не се променя значително ( $P > 0.05$ ) както между отделните температури, така и между НСИ и ВСИ при всяка температура. Температурите от 25 и  $30^\circ\text{C}$  стимулират натрупването на въглехидрати. При  $30^\circ\text{C}$  стимулиращият ефект е значително по-голям при ВСИ в сравнение с НСИ, докато при  $25^\circ\text{C}$ , НСИ стимулира по-силно въглехидратната синтеза. Така *Scenedesmus* sp. BGP натрупва най-много въглехидрати при ВСИ и температура от  $30^\circ\text{C}$  ( $1.64 \pm 0.17 \text{ g L}^{-1}$  или 42% от АСВ).

Температурата оказва по-голямо влияние върху синтеза на липиди от светлинния интензитет, както се вижда от промените в липидното съдържание в биомасата на *Scenedesmus* sp. BGP (Фигура 2С). При оптималната ( $25^\circ\text{C}$ ) и субоптималните температури, количеството на липидите е почти еднакво ( $P > 0.05$ ) при НСИ, но повишаването на температурата води до постепенен и значителен спад в липидното съдържание. При ВСИ обаче, най-голямо количество липиди се получава при  $25^\circ\text{C}$ , а с отдалечаване от температурния оптимум и в двете посоки количеството им значително намалява. За отбелязване е, че за всяка култивационна температура, с изключение на оптималната, разликата в липидното съдържание при НСИ спрямо ВСИ е незначителна ( $P > 0.05$ ).



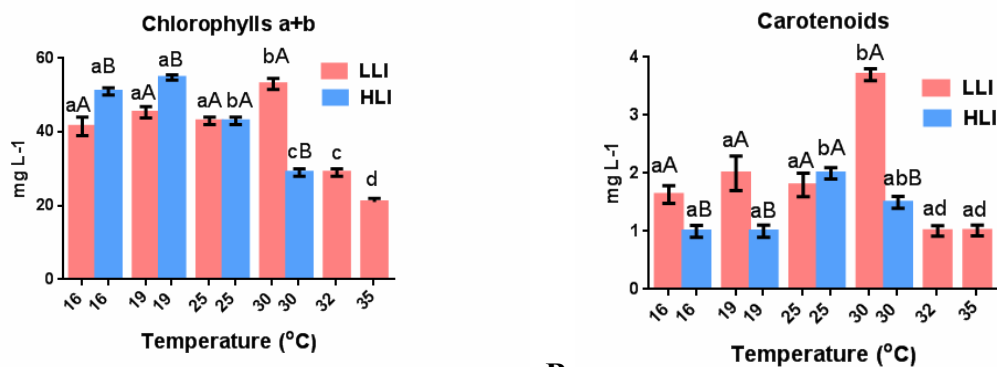
**Фигура 2.** Количество на белтъци (А), въглехидрати (В) и липиди (С) ( $\text{g L}^{-1}$ ) в биомасата на *Scenedesmus* sp. BGP като функция от култивационната температура и светлинна интензивност. LLI (НСИ),  $132 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  едностранно осветяване; HLI (ВСИ),  $2 \times 132 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  двустранно осветяване. Средните стойности означени с различни малки букви се различават значително ( $P < 0.05$ ) между температурите за специфична интензивност на светлината. Различните главни букви показват значителна разлика ( $P < 0.05$ ) за специфична температура между НСИ и ВСИ.

От получените резултати за съвместното въздействие на температурата и светлината върху биохимичния състав на *Scenedesmus* sp. BGP може да се направи извода, че най-голямо количество белтъци, въглехидрати и липиди се получава при приложената по-висока светлинна интензивност и оптималната за растеж температура (белтъци и липиди) или температура, близка до оптималната (30°C, въглехидрати). Способността на този щам да натрупва ценни компоненти на биомасата при благоприятни за растежа му условия е важна и полезна характеристика.

С максимален добив на биомаса от 5.7 g L<sup>-1</sup>, максимално протеиново съдържание от 44.6% от АСВ, 42.2% въглехидрати и 23.6% липиди, българският щам се нарежда сред изследваните видове/щамове от род *Scenedesmus*, най-добри продуценти на биомаса и нейни ценни компоненти.

### 1.3. Влияние на температурата и светлината върху съдържанието на пигменти при *Scenedesmus* sp. BGP

В условия на НСИ, общото съдържание на хлорофили (*a+b*) в клетките на *Scenedesmus* sp. BGP при субоптималните температури не се различава значително ( $P>0.05$ ) от това при оптималната температура (Фигура 3А). Количеството на тези пигменти е най-високо ( $P<0.05$ ) във водораслото култивирано при 30°C. С повишаване на култивационната температура на 32 и 35°C, се наблюдава значителен спад в стойностите им. При ВСИ количеството на общите хлорофили е по-голямо в клетките отглеждани при субоптималните температури, отколкото при оптималната ( $P<0.05$ ), а при 30°C е значително по-малко. Интересно е, че при *Scenedesmus* sp. BGP, ВСИ стимулира хлорофилната синтеза при субоптималните температури, докато при температури над оптималната, съдържанието на хлорофили е по-високо при НСИ в сравнение с ВСИ. При 30°C например, общите хлорофили са с 83% повече при НСИ, отколкото при ВСИ.



А

В

**Фигура 3.** Количество (mg L<sup>-1</sup>) на хлорофил *a* + хлорофил *b* (А) и каротеноиди (В) на *Scenedesmus* sp. BGP като функция от култивационната температура и светлинна интензивност. LLI (НСИ), 132 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> едностранно осветяване; HLI (ВСИ), 2×132 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> двустранно осветяване. Средните стойности означени с различни малки букви се различават значително ( $P<0.05$ ) между температурите за специфична интензивност на светлината. Различните главни букви показват значителна разлика ( $P<0.05$ ) за специфична температура между НСИ и ВСИ.

Съдържанието на каротеноиди в биомасата на *Scenedesmus* sp. BGP при 30°C, НСИ и 25°C, ВСИ е по-високо ( $P<0.05$ ) отколкото при другите условия на култивиране

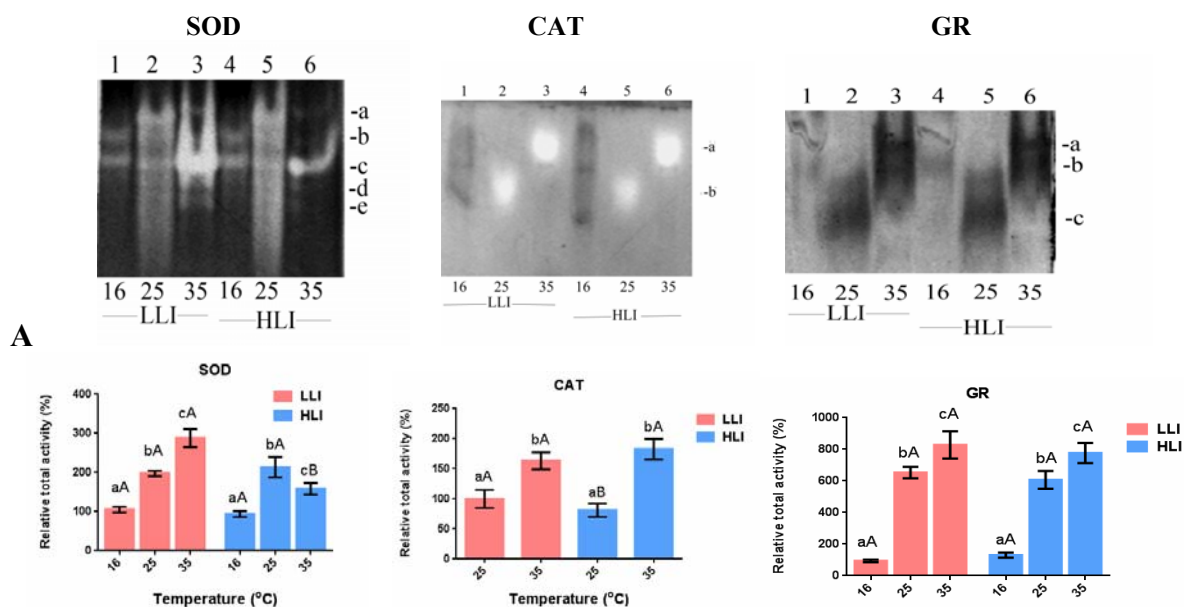
(Фигура 3В). В сравнение с ВСИ, НСИ стимулира синтеза на каротеноиди при всички култивационни температури, с изключение на оптималната, при която разликата в количеството на тези пигменти между НСИ и ВСИ е незначителна ( $P>0.05$ ).

Комбинацията от ВСИ и температури над  $30^{\circ}\text{C}$  води до съдържание на каротеноиди, както и на хлорофили под границата за определянето им. Отдавна е известно, че високите температури, особено когато действат съвместно с високи светлинни интензивности, водят до разграждане на пигментите и обезцветяване на водорасловата суспензия (Richmond, 2004).

Пигментното съдържание на *Scenedesmus* sp. BGP е в границите, установени за други водорасли от същия род, култивирани в отсъствие на стрес (Velichkova et al., 2013; Kent et al., 2015; Patias et al., 2017; Toledo-Cervantes et al., 2018).

#### 1.4. Влияние на култивационната температура и светлинната интензивност върху изоензимния профил и активността на антиоксидантни ензими на *Scenedesmus* sp. BGP

За тези изследвания, *Scenedesmus* sp. BGP е култивиран при три избрани от предходните експерименти температури – минималната ( $16^{\circ}\text{C}$ ), оптималната ( $25^{\circ}\text{C}$ ) и максималната ( $35^{\circ}\text{C}$ ) при НСИ и ВСИ. Проследени са промените в изоензимните профили и активностите на супероксид дисмутаза (SOD), каталаза (CAT) и глутатион редуктаза (GR), за да се оцени ефективността на ензимната антиоксидантна защитна система на водораслото при преодоляване на неблагоприятни култивационни условия.



**В**  
**Фигура 4.** Изоензимен профил (А) и относителна обща активност на SOD, GR и активност на CAT (В) на *Scenedesmus* sp. BGP, отглеждан при три различни температури ( $16$ ,  $25$  и  $35^{\circ}\text{C}$ ) и две нива на осветяване (НСИ и ВСИ). В (А), с букви са означени ивиците с ензимна активност по реда на нарастващата им електрофоретична подвижност. Във всяка ямка са нанесени равни количества белтък ( $7.5\ \mu\text{g}$ ). В (В), стойностите за SOD и GR са представени спрямо общата ензимна активност на пробата от  $16^{\circ}\text{C}$ , НСИ, а за CAT спрямо активността на ивицата в пробата от  $25^{\circ}\text{C}$  и НСИ, които условно са приети за 100%. Средните стойности означени с различни малки букви се различават значително ( $P<0.05$ ) между температурите за специфична интензивност на светлината. Различните главни букви показват значителна разлика ( $P<0.05$ ) за специфична температура между НСИ и ВСИ.

Във всички изследвани проби, SOD на *Scenedesmus* sp. BGP е представена от 5 ивици със SOD активност, CAT от една ивица, но с различна електрофоретична подвижност, а GR от 3 ивици (**Фигура 4А**). За разлика от броя, интензитетът (активността) на ивиците се променя значително в зависимост от култивационните условия, особено при промяна на температурата.

Растежът се счита за един от най-важните параметри, свързани с температурния и други видове абиотичен стрес. Максималната температура (35°C) и при двете светлинни интензивности води до значително забавяне на растежа на *Scenedesmus* sp. BGP (**Фигура 1**) и повишаване на активността на CAT, GR (**Фигура 4В**) и на изоформа с на SOD (**Фигура 4А**), свързани с температурен стрес. Активирането на антиоксидантните ензими и/или на техни изоформи (изоформа с на SOD, изоформа а на GR) (**Фигура 4А и 4В**) предполага участието им в механизмите на оцеляване на водораслото при тези екстремни условия. Следователно, добрият растеж и понижената активност на SOD и GR при 16°C (**Фигури 1 и 4В**) могат да се считат като показатели за слаб или липсващ оксидативен стрес при най-ниската температура.

## 2. Влияние на началната плътност на културата върху продуктивността на биомаса от *Scenedesmus* sp. BGP

Изследван е растежът на *Scenedesmus* sp. BGP при пет различни начални плътности на културата с цел да се установи стартовата плътност, при която се постига най-висока продуктивност на водораслова биомаса. Култивирането е проведено в стандартната хранителна среда при 24°C, НСИ (132  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) и непрекъснато продухване с въздух, обогатен с 2% въглероден диоксид за 72 часа.

**Таблица 2.** Изменение на количеството биомаса (АСВ) с времето на култивиране, продуктивност на биомаса и скорост на растеж [ $\mu$ ] на *Scenedesmus* sp. BGP на 72-рия час в зависимост от стартовата плътност на културата.

0h АСВ ( $\text{g L}^{-1}$ )	24h АСВ ( $\text{g L}^{-1}$ )	48h АСВ ( $\text{g L}^{-1}$ )	72h АСВ ( $\text{g L}^{-1}$ )	[ $\mu$ ]	Продуктивност ( $\text{g АСВ L}^{-1} \text{d}^{-1}$ )
0.2	0.60±0.04 a	1.23±0.07 a	1.64±0.12 a	0.70±0.02 a	0.48±0.04 a
0.4	0.76±0.05 b	1.43±0.12 b	1.73±0.11 a	0.49±0.02 b	0.44±0.04 a
0.6	0.87±0.04 c	1.56±0.14 b	1.80±0.12 a	0.37±0.02 c	0.40±0.04 a
0.8	1.70±0.12 d	3.40±0.20 c	4.42±0.2 b	0.57±0.02 d	1.21±0.07 b
1.0	1.90±0.15 d	3.60±0.20 c	4.26±0.2 b	0.48±0.02 b	1.09±0.07 b

Средните стойности за всеки параметър означени с различни малки букви се различават значително ( $P < 0.05$ ) между стартовите плътности на културите.

Получените резултати, представени на **Таблица 2** показват, че при повишаване на началната плътност от 0.2 до 0.6  $\text{g L}^{-1}$ , скоростта на растеж постепенно намалява, довеждайки до сходно нарастване на количеството биомаса на ден (0.48±0.04, 0.44±0.04 и 0.40±0.04  $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ), докато при по-високите стартови плътности (0.8 и 1.0) продуктивността на водораслова биомаса е значително по-висока ( $P < 0.05$ ). При най-ниската приложена начална плътност (0.2  $\text{g L}^{-1}$ ), скоростта на растеж на *Scenedesmus* sp. BGP е най-висока ( $[\mu] = 0.70 \pm 0.01$ ) и продуктивността на биомаса е колкото получената при начална плътност от 0.4 и 0.6  $\text{g L}^{-1}$ , което разкрива *високата адаптивност* на българския щам към абиотичните фактори на които е изложен. От всички изследвани начални плътности, при използването на 0.8  $\text{g L}^{-1}$  се постига максималната за приложените култивационни условия продуктивност от 1.21  $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$  (около 2.7 пъти по-висока от тази при по-ниските стартови плътности), макар



скоростта на растеж ( $[\mu] = 0.57$ ) да е с около 19% по-ниска от най-високата. Това е най-подходящата начална плътност за култивиране на щама както в лабораторни условия, така и за култивиране в по-големи мащаби.

3. Влияние на азотния източник и концентрацията на хранителната среда при *Scenedesmus* sp. BGP и на азотния източник при *Chlorella vulgaris* R-06/2 върху растежа и биохимичния състав на водораслите

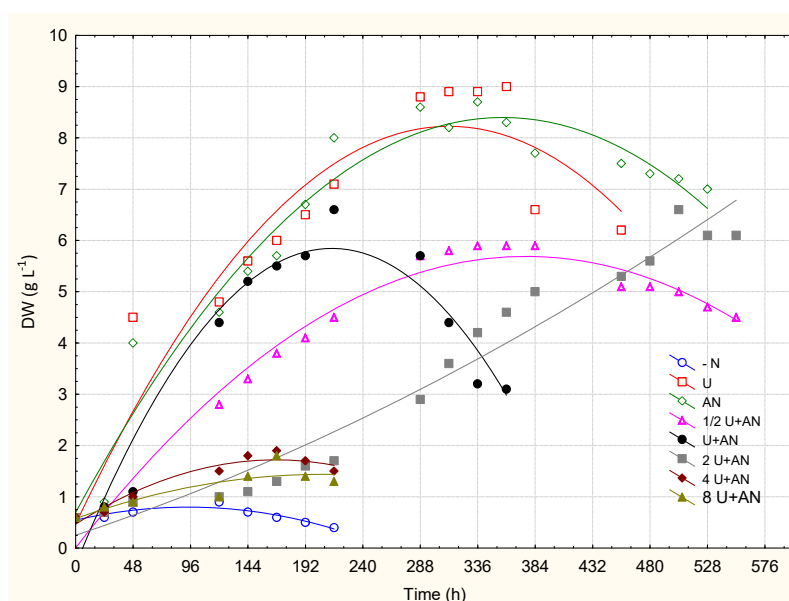
За тези експерименти са използвани стандартната хранителна среда (U+AN) и пригответите за целта, базирани на нея варианти, описани подробно в *Материали и методи*, 2. "Поддържане и лабораторно култивиране на водораслите (страница 5). За *Scenedesmus* sp. BGP вариантите са: -N, U, AN,  $\frac{1}{2}x$  U+AN, 2x U+AN, 4x U+AN и 8x U+AN, а за *Chlorella vulgaris* R-06/2: -N, U, AN.

Култивирането е извършено при температура 24°C за *Scenedesmus* sp. BGP и 30°C за *Chlorella vulgaris* R-06/2, ниска светлинна интензивност ( $132 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) и непрекъснато снабдяване на културите с 2% CO<sub>2</sub>. Началната плътност на всички култури на *Scenedesmus* sp. BGP е  $0.61 \pm 0.04 \text{ g L}^{-1}$ , а на *Chlorella vulgaris* R-06/2 е  $0.83 \pm 0.05 \text{ g L}^{-1}$ .

### 3.1. Растеж

#### 3.1.1. Растеж на *Scenedesmus* sp. BGP

При наблюдение на растежа в разрежена среда ( $\frac{1}{2}x$  U+AN) се забелязва, че *Scenedesmus* sp. BGP расте значително по-бавно отколкото в стандартната среда (U+AN) ( $[\mu]/5 = 0.30 \pm 0.02$  и  $0.395 \pm 0.004$ , съответно), достигайки почти същия максимален добив на биомаса ( $5.9 \pm 0.2$  и  $6.6 \pm 0.2 \text{ g L}^{-1}$ ), но след по-продължително култивиране (на 14-ти и 9-ти ден, съответно) (Фигура 5). От трите варианта на средата с по-висока концентрация на компонентите в сравнение със стандартната среда (2x, 4x и 8x U+AN), културата расте най-добре в 2x U+AN средата. При тази култура се наблюдава дълга адаптационна фаза, която преминава в продължителна експоненциална фаза, достигайки максимален добив от  $6.6 \pm 0.3 \text{ g L}^{-1}$  на 21-я ден (Фигура 5).



Фигура 5. Растежни криви на *Scenedesmus* sp. BGP, култивиран в хранителни среди с различен азотен източник или различна концентрация на средата.

Резултатите показват, че при концентриране на средата, азотният източник и/или друг/други от минералните елементи са в излишък, което не ускорява растежа, а го забавя (2x U+AN средата) или силно го инхибира (при 4x и 8x U+AN вариантите на средата; **Фигура 5**).

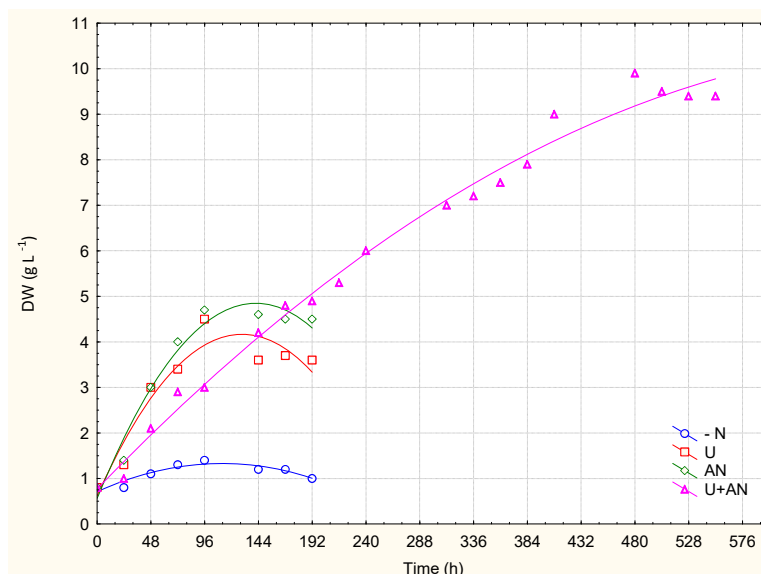
От всички варианти на средата, *най-добър растеж (най-високи стойности на  $[\mu]$  и АСВ) на *Scenedesmus sp. BGP* се наблюдава при използването на двете среди само с един азотен източник – амониев нитрат или карбамид (**Фигура 5**). Максималният добив на средата с карбамид е достигнат на 13-тия ден и е  $8.9 \pm 0.2 \text{ g L}^{-1}$ . На средата с амониев нитрат максималният добив е  $8.7 \pm 0.2 \text{ g L}^{-1}$ , регистриран на 14-тия ден. При сравняване със стандартната среда, на пръв поглед изглежда сякаш култивирането на тези две среди е по-малко ефикасно, защото на U+AN средата най-високият добив е измерен на 9-тия ден, т.е. за по-кратко време и дори по-ниските стойности на добива ( $6.6 \pm 0.2 \text{ g L}^{-1}$ ) биха могли да бъдат компенсирани. При по-внимателно разглеждане на данните се вижда, че още на осмия ден културите в средите само с амониев нитрат (AN) и само карбамид (U) са достигнали добив от съответно  $6.7 \pm 0.2 \text{ g L}^{-1}$  и  $6.5 \pm 0.2 \text{ g L}^{-1}$  ( $[\mu]/8 = 0.2997 \pm 0.072$  и  $0.296 \pm 0.011$ , съответно), докато при културата в средата U+AN стойностите на двата параметъра са  $5.7 \pm 0.1 \text{ g L}^{-1}$  и  $[\mu]/8 = 0.28 \pm 0.01$ ). След деветия ден, културата в средата с два азотни източника навлиза в стационарна фаза, докато културите с по един азотен източник в средата продължават да растат и натрупват биомаса (**Фигура 5**).*

### 3.1.2. Растеж на *Chlorella vulgaris* R-06/2

При използване на всеки един от двата варианта на средата с по един азотен източник (амониев нитрат или карбамид), българският щам на *Chlorella vulgaris* показва по-добър растеж и продуктивност в сравнение със стандартната среда, но само през първите 96 часа на експеримента (**Фигура 6**). На втория и четвъртия ден, стойностите на АСВ и  $[\mu]$  на културите, отглеждани на среди само с амониев нитрат и само карбамид не се различават помежду си ( $P > 0.05$ ), но са значително по-високи ( $P < 0.05$ ) от тези на водораслото, отглеждано на средата с двата азотни източника ( $\mu = 0.64 \pm 0.04$ ,  $0.64 \pm 0.03$ ,  $0.46 \pm 0.01$ , съответно на втория ден и  $\mu = 0.434 \pm 0.018$ ,  $0.423 \pm 0.018$ ,  $0.321 \pm 0.023$ , съответно на четвъртия ден). На 8-ия ден на култивиране обаче, стойността на АСВ в стандартната среда ( $4.9 \pm 0.2$ ) е сходна ( $P > 0.05$ ) с тази на културата с амониев нитрат ( $4.5 \pm 0.2$ ), докато водораслото отглеждано с карбамид показва най-ниската стойност ( $3.6 \pm 0.1$ ,  $P < 0.05$ ). Следва да се отбележи, че по това време културите с по един азотен източник в средата са в стационарна фаза на растеж, докато в стандартната среда експоненциалният растеж на *Chlorella vulgaris* R-06/2 продължава до 20-ия ден, когато АСВ достига  $9.9 \pm 0.1 \text{ g L}^{-1}$  (над 2 пъти по-висок максимален добив от този на другите две култури, но при 5 пъти по-продължително култивиране) (**Фигура 6**).

На среда без азотен източник *Chlorella vulgaris* R-06/2 расте по-бързо ( $[\mu]/4 = 0.13 \pm 0.03$ ) от *Scenedesmus sp. BGP* ( $[\mu]/5 = 0.077 \pm 0.019$ ), но по краткотрайно (до 96-ия час), като двата щама достигат стойности на АСВ от  $1.4 \pm 0.1 \text{ g L}^{-1}$  и  $0.9 \pm 0.1 \text{ g L}^{-1}$ , съответно (**Фигури 5 и 6**). Растежът е много слаб, което вероятно се дължи на изчерпване на наличния вътреклетъчния азотен запас.





**Фигура 6.** Растежни криви на *Chlorella vulgaris* R-06/2, култивирана в хранителни среди с различен азотен източник.

От тези резултати следва заключението, че средата с карбамид и средата с амониев нитрат са по-подходящи за култивиране на *Scenedesmus* sp. BGP в сравнение със среда, съдържаща двата азотни източника. При *Chlorella vulgaris* R-06/2, според целите на култивиране, средата със смес от карбамид и амониев нитрат е по-подходяща за получаване на голямо количество биомаса при по-продължително култивиране, докато средите само с един от двата азотни източника осигуряват по-бърз растеж за сметка на по-нисък максимален добив. Получените резултати може да са следствие на по-ефективното използване (при *Scenedesmus* sp. BGP) или по-високата скорост на асимилация (при *Chlorella vulgaris* R-06/2) на един азотен източник, в сравнение с комбинация от азотни източници.

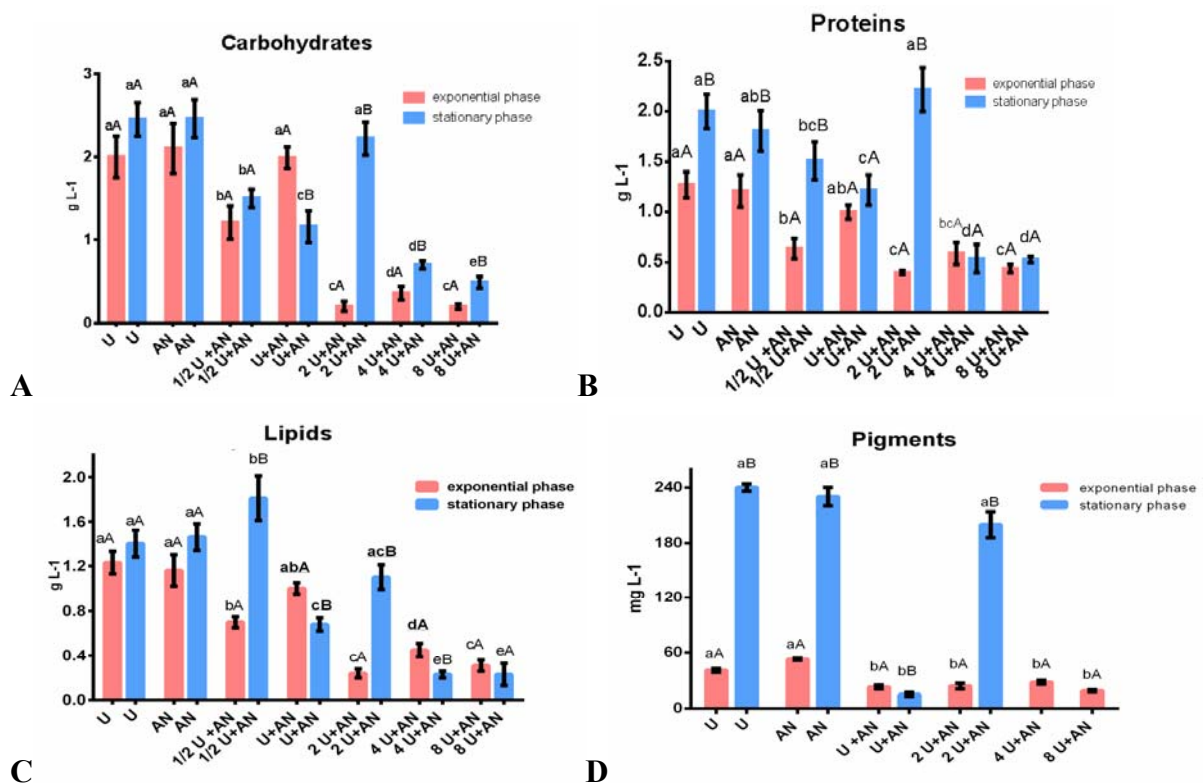
### 3.2. Биохимичен състав

#### 3.2.1. Биохимичен състав на *Scenedesmus* sp. BGP

При приложените култивационни условия, количеството на въглехидратите в биомасата на *Scenedesmus* sp. BGP е в рамките на  $0.20 \pm 0.01$ – $2.45 \pm 0.20$  g L<sup>-1</sup> (Фигура 7А). При култивиране на среди със само един азотен източник и като цяло в по-разредени среди (U, AN, ½x U+AN и U+AN) продукцията на въглехидрати е висока и показва ниска степен на вариация както между отделните среди с една и съща концентрация на азот (U, AN, U+AN) ( $P > 0.05$ ), така и между фазите на растеж (при средите U, AN и ½x U+AN) ( $P > 0.05$ ). Само при по-продължително култивиране на водораслото на стандартната среда, количеството на този биохимичен компонент намалява двойно в сравнение с експоненциална фаза. При използване на останалите среди, съдържанието на въглехидрати е ниско в експоненциална фаза ( $0.20 \pm 0.04$ – $0.36 \pm 0.08$  g L<sup>-1</sup>), а при достигане на стационарна фаза, стойностите им се повишават - почти двойно при средите 4x и 8x U+AN и 10 пъти при 2x U+AN.

Белтъчното съдържание на *Scenedesmus* sp. BGP варира между  $0.44 \pm 0.02$  и  $2.22 \pm 0.20$  g L<sup>-1</sup> (Фигура 7В). В експоненциална фаза, в културите расли в среди с различен азотен източник, но еднаква концентрация на азот (U, AN, U+AN) се натрупва най-голямо количество белтъци, като предимство показват средите само с един азотен източник. Във всички други среди, добивът на белтъци е под 1.0 g L<sup>-1</sup>. В стационарна фаза се наблюдава повишаване на количеството на белтъците в сравнение с експоненциална фаза ( $P < 0.05$ ) за всички среди, с изключение на средите с високи

концентрации на солите (4x и 8x U+AN) и стандартната среда, където разликите в белтъчното съдържание между растежните фази са незначителни ( $P>0.05$ ).



**Фигура 7.** Количество на въглехидрати (A), белтъци (B), липиди (C) ( $\text{g L}^{-1}$ ) и пигменти (D) ( $\text{mg L}^{-1}$ ) в биомасата на *Scenedesmus* sp. BGP при култивиране на водораслото в хранителни среди с различен азотен източник и различни концентрации на средата с карбамид и амониев нитрат до експоненциална и стационарна фаза на растеж. Средните стойности означени с различни малки букви се различават значително ( $P<0.05$ ) между вариантите на средата. Различните главни букви показват значителна разлика ( $P<0.05$ ) между фазите на растеж за една и съща среда.

Количеството на липидите в експоненциална фаза е най-голямо в културите на *Scenedesmus* sp. BGP, отглеждани в средите с един азотен източник (около  $1.2 \text{ g L}^{-1}$ ) следвани от културата в стандартната среда ( $1.0 \pm 0.2 \text{ g L}^{-1}$ ) (Фигура 7C). Водораслото расло на среда  $\frac{1}{2}x$  U+AN има значително по-ниско липидно съдържание ( $0.7 \pm 0.1 \text{ g L}^{-1}$ ). При по-високите концентрации на средата (2x, 4x и 8x U+AN) липидната продукция е най-ниска ( $P<0.05$ ) и достига едва до  $0.45 \pm 0.02 \text{ g L}^{-1}$ . Като процент от АСВ обаче, съдържанието на липиди в културите, отглеждани на средите 4x и 8x U+AN е 31-32% и е по-високо от това на останалите култури. Съчетано с наблюденията слаб растеж (Фигура 5), натрупването на липиди във водорасловата биомаса е указание за стрес при тези две култури. С навлизане на културите в стационарна фаза, количеството на липидите не се променя съществено на средите с един азотен източник, както и на средата 8x U+AN ( $P>0.05$ ). Значително повишение ( $P<0.05$ ) в липидното съдържание се наблюдава на средите  $\frac{1}{2}x$  U+AN и 2x U+AN. Културата, отглеждана на среда  $\frac{1}{2}x$  U+AN има над 2.5 пъти повече липиди в стационарна в сравнение с експоненциална фаза и отчетеният добив на липиди от  $1.8 \pm 0.1 \text{ g L}^{-1}$  е най-високият, постигнат при проведените експерименти. Допускаме, че в този случай, допълнителното разреждане с времето на култивиране на и без това разрежданата среда е стресов фактор водещ до натрупване на липиди. Въпреки увеличеното с около 4.5 пъти липидно съдържание при

използване на средата 2x U+AN, добивът от  $1.1 \pm 0.1 \text{ g L}^{-1}$  е по-нисък в сравнение с този на  $\frac{1}{2}$ x U+AN, U и AN средите. Понижението на липидното съдържание в биомасата на водораслото, расло в най-концентрираните среди както нетно, така и като % от АСВ, вероятно е свързано с намаляване на концентрацията на елементите на средата поради усвояването им от клетките при по-продължителното култивиране (т.е. отпадане на стресовия фактор).

В експоненциална фаза на растеж на *Scenedesmus* sp. BGP, общото количество на пигменти (хлорофил *a* + хлорофил *b* + каротеноиди) е в диапазона от  $23 \pm 3$  до  $53 \pm 7 \text{ mg L}^{-1}$  (Фигура 7D). Пигментното съдържание е най-високо във водораслото култивирано в средите с един азотен източник ( $P < 0.05$ ). На всички останали среди, разликите в количеството на синтезираните пигменти са незначителни ( $P > 0.05$ ). В стационарна фаза, културите расли в U, AN и 2x U+AN средите повишават многократно продукцията на пигменти, като стойността на пигментите в 2x U+AN средата достига стойностите при останалите две среди ( $P > 0.05$ ). Водораслото, култивирано в стандартната среда понижава пигментното си съдържание в стационарна фаза с около 35% ( $P < 0.05$ ). Културите на средите 4x и 8x U+AN се обезцветяват. При използване на среда  $\frac{1}{2}$ x U+AN, въпреки очевидното наличие на пигментиране и многократните повторения на анализа, не беше възможно да се определи количество на пигментите спектрофотометрично, при съответните дължини на вълните.

### 3.2.2. Биохимичен състав на *Chlorella vulgaris* R-06/2

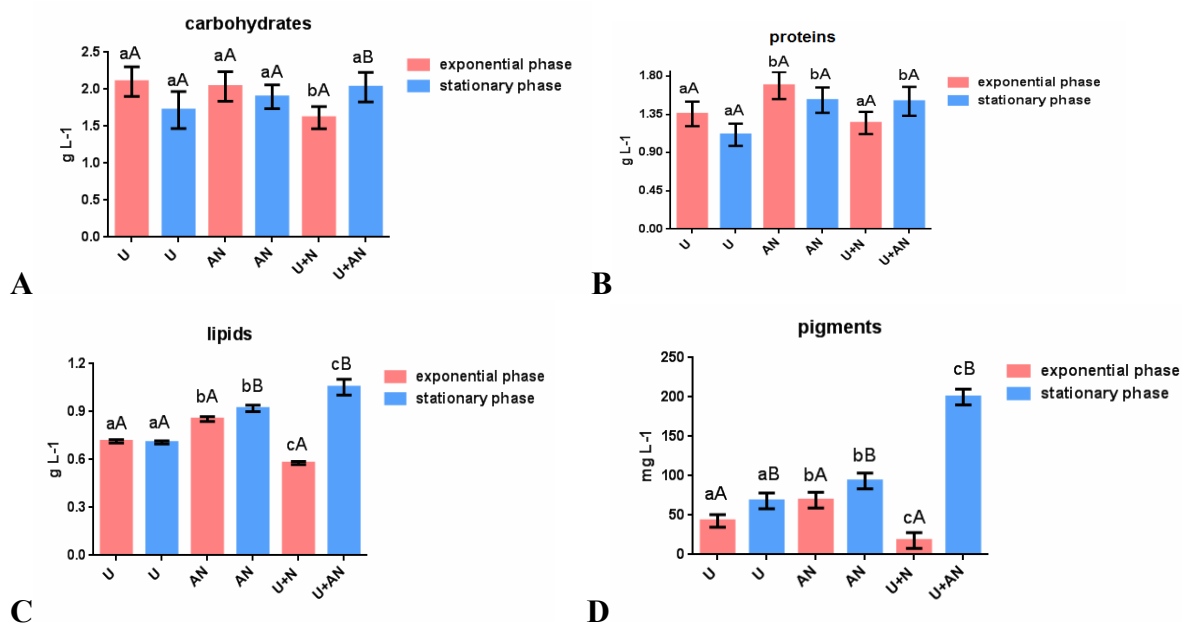
При *Chlorella vulgaris* R-06/2 количеството на въглехидратите е най-високо в сравнение с останалите биохимични компоненти и не се влияе значително ( $P > 0.05$ ) нито от азотния източник в средата, в която е култивиран щама, нито от фазата на растеж. Стойностите се променят слабо от  $1.6 \pm 0.2$  до  $2.1 \pm 0.2 \text{ g L}^{-1}$ . Само при използване на стандартната среда (U+AN) се отчита значително понижение в количеството на въглехидратите ( $P < 0.05$ ) в експоненциална в сравнение със стационарна фаза, както и в сравнение с другите две експоненциално растящи култури (Фигура 8A).

Белтъчното съдържание в биомасата на *Chlorella vulgaris* R-06/2 е в границите на  $1.1 \pm 0.2$  –  $1.7 \pm 0.2 \text{ g L}^{-1}$ . (Фигура 8B). Във фазата на експоненциален растеж, количеството на този компонент е най-високо при отглеждане на щама в среда с амониев нитрат (AN). В стационарна фаза, в средите с AN и U+AN водораслото произвежда сходни количества белтъци ( $P > 0.05$ ), по-големи от това в средата с карбамид (U) ( $P < 0.05$ ). При трите варианта на азотен източник в средата, времето на култивиране няма значителен ефект върху добива на белтъци ( $P > 0.05$ ).

Липидното съдържание в биомасата на *Chlorella vulgaris* R-06/2 е в диапазона  $0.58 \pm 0.11$  –  $1.1 \pm 0.1 \text{ g L}^{-1}$  (Фигура 8C). Водораслото, култивирано в среда с амониев нитрат произвежда значително по-голямо количество липиди, в сравнение с културата расла с карбамид, независимо от фазата на растеж. Средата с два азотни източника потиска ( $P < 0.05$ ) липидната синтеза в експоненциална фаза, но в стационарна фаза съдържанието на липиди се увеличава почти двойно и достига най-високата от всички стойности ( $1.1 \pm 0.1 \text{ g L}^{-1}$ ,  $P < 0.05$ ). При културата с азотен източник карбамид фазата на растеж не повлиява липидния добив докато амониевият нитрат има стимулиращ ефект в стационарна фаза.

Количеството на пигментите (хлорофил *a* + хлорофил *b* + каротеноиди) на *Chlorella vulgaris* R-06/2 се влияе значително ( $P < 0.05$ ) както от избора на азотен източник в средата, така и от фазата на растеж (Фигура 8D). В експоненциална фаза, при средите с азотен източник само карбамид и само амониев нитрат, пигментното

съдържание е  $43 \pm 3$  и  $69 \pm 4$  mg L<sup>-1</sup> и нараства до около  $70 \pm 4$  и  $94 \pm 4$  mg L<sup>-1</sup> в стационарна фаза. При стандартната среда повишението е с около 11 пъти (от  $19 \pm 2$  до  $200 \pm 17$  mg L<sup>-1</sup>), но се наблюдава след 20-дневно култивиране.



**Фигура 8.** Количество на въглехидрати (A), белтъци (B), липиди (C) (g L<sup>-1</sup>) и пигменти (D) (mg L<sup>-1</sup>) в биомасата на *Chlorella vulgaris* R-06/2 при култивиране на водораслото в хранителни среди с различен азотен източник до експоненциална и стационарна фаза на растеж. Средните стойности означени с различни малки букви се различават значително ( $P < 0.05$ ) между вариантите на азотен източник. Различните главни букви показват значителна разлика ( $P < 0.05$ ) между фазите на растеж за една и съща среда.

Анализът на получените резултати от тази група експерименти показва, че:

– при *Scenedesmus* sp. BGP, културите растящи експоненциално в средите с един азотен източник (карбамид или амониев нитрат) синтезират сходни и най-големи количества белтъци, липиди и въглехидрати, следвани от културата в стандартната среда (U+AN). В културата расла в разрежена среда ( $\frac{1}{2}$  U+AN) количеството на тези метаболити е междинно, докато при използване на концентрираните среди (2x, 4x и 8x U+AN) добивът на трите основни класа биохимични компоненти е най-нисък. Количеството на пигментите е най-високо при използване на средите с един азотен източник ( $P < 0.05$ ). При използване на останалите среди, разликите в количеството им са незначителни ( $P > 0.05$ );

– в сравнение с експоненциално растящите, в културите на *Scenedesmus* sp. BGP отглеждани в средите с по един азотен източник до стационарна фаза, количеството на въглехидрати и липиди не се променя значително ( $P > 0.05$ ), докато добивът на белтъци се увеличава ( $P < 0.05$ ). При отглеждане в стандартната среда, количеството на въглехидратите и липидите в биомасата значително се понижава, без това да се отрази на количеството на белтъците. По-продължителното култивиране на среда  $\frac{1}{2}$ x U+AN благоприятства натрупването на белтъци и особено на липиди. Многократно повишено количество на всички биохимични компоненти се отчита при използване на средата 2x U+AN, като добивите им достигат, но не надвишават тези при използване на средите с по един азотен източник. В средите с най-високи концентрации само добивът на въглехидрати нараства, но въпреки това остава най-нисък в сравнение с този при другите среди. В стационарна фаза на растеж на *Scenedesmus* sp. BGP се регистрира

значително натрупване на пигменти при всички зелено пигментирани култури, освен тази, расла в стандартната среда;

– при *Chlorella vulgaris* R-06/2, в експоненциална фаза на растеж количеството на белтъци, липиди и пигменти е най-голямо при култивиране на водораслото в среда, съдържаща амониев нитрат. Количеството на синтезираните въглехидрати не се различава значително ( $P>0.05$ ) при използване на средите с по един азотен източник, но е по-голямо от това при стандартната среда ( $P<0.05$ ). Добавянето на двата азотни източника в средата води до получаването на най-нисък добив на въглехидрати, липиди и пигменти, като само добивът на белтъци не се различава значително ( $P>0.05$ ) от този при култивирането с карбамид водорасло;

– количеството на въглехидрати и белтъци в биомасата на *Chlorella vulgaris* R-06/2 расла в среди с по един азотен източник не се повлиява значително от фазата на растеж. В среда с амониев нитрат, водораслото синтезира повече липиди и пигменти в стационарна, отколкото в експоненциална фаза и само количеството на пигментите нараства в средата с карбамид ( $P<0.05$ ). Най-забележим е ефектът на времето на култивиране при използване на стандартната среда (U+AN). При тази култура се наблюдава нарастване на количеството на всички изследвани биохимични компоненти в стационарна фаза, като само за белтъците  $P>0.05$ . От трите култури на *Chlorella vulgaris* R-06/2 в стационарна фаза на растеж тази, отглеждана в среда U+AN синтезира най-голямо количество липиди, пигменти и въглехидрати, макар разликата в добива на въглехидрати между трите среди да е незначителна.

*От това следва да се заключи, че среда с карбамид и среда с амониев нитрат са вариантите на средата, при които в експоненциално растящите култури на Scenedesmus sp. BGP добивът на въглехидрати, белтъци, липиди и пигменти е най-голям, при запазен баланс на състава на биомасата, наличие на най-висока скорост на растеж, относително ниска концентрация на соли в средата, краткотрайно култивиране и липса на стрес. При култивиране на Chlorella vulgaris R-06/2 до експоненциална фаза на растеж, най-висок добив на липиди, белтъци и пигменти се постига в среда с амониев нитрат, а на въглехидрати – в среда с амониев нитрат и среда с карбамид. В стационарна фаза на растеж, добивът на липиди и пигменти при културата расла в среда със смес от двата азотни източника е най-голям от всички приложени култивационни условия, но при най-продължително култивиране.*

Резултатите от нашите изследвания, заедно с литературните данни, показват, че изборът на азотен източник повлиява не само растежа, но и биохимичния състав на микроводорасловата биомаса, както и че отговорите към различните източници на азот са строго специфични за отделните видове/щамове. Като обща тенденция може да се отбележи, че намаленото количество азот в клетките (дължащо се на неефективното му усвояване от приложения азотен източник или на остаряването на културите) води до повишена синтеза на въглехидрати или липиди, или и на двата компонента. Малко проучвания показват, че самият азотен източник може да стимулира продукцията на липиди, въглехидрати и белтъци (Lourenço et al., 2002); на липиди (Agwa и Abu, 2016); или на белтъци (El-Sheekh et al. 2004). В допълнение към малкото примери е установеният в настоящото изследване стимулиращ ефект на карбамид, както и на амониев нитрат при *Scenedesmus* sp. BGP и на амониев нитрат при *Chlorella vulgaris* R-06/2 върху добива на пигменти, липиди и белтъци във фазата на експоненциален растеж на двете водорасли.

4. Влияние на азотния източник в хранителната среда върху активността на метаболитни и антиоксидантни ензими, протеази и естерази на *Chlorella vulgaris* R-06/2 и *Scenedesmus* sp. BGP

Промените в изоензимния профил и активността на избрани ензими, свързващи азотния и въглеродния метаболизъм са проследени по време на експоненциална и стационарна фаза на растеж на *Scenedesmus* sp. BGP и *Chlorella vulgaris* R-06/2, за да се характеризират по-добре метаболитните отговори на водораслите към различни азотни източници в хранителната среда.

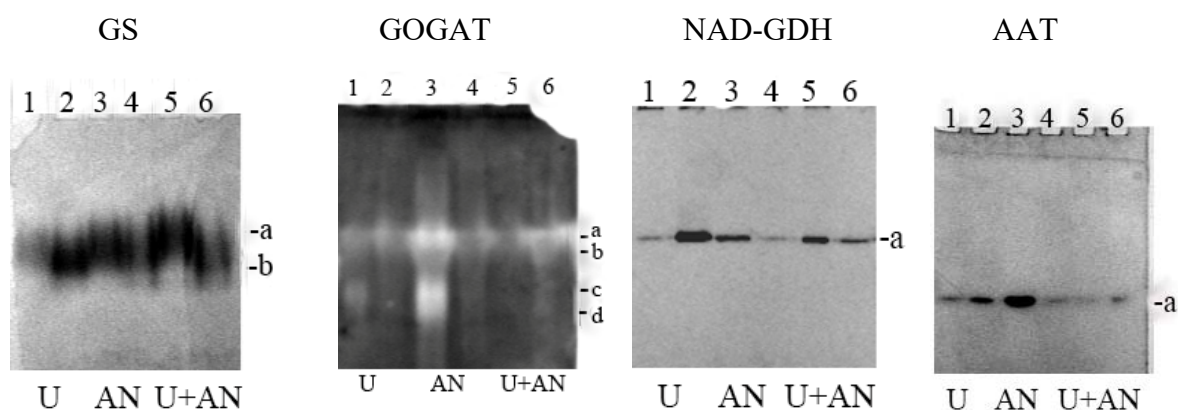
Тези изследвания са проведени с двете зелени водорасли, култивирани в хранителна среда на Setlik (1967), модифицирана от Георгиев и сътр. (1978), разреждана до ¼ от оригиналната концентрация (съдържаща амониев нитрат+карбамид, стандартна среда), или на същата среда, но със само амониев нитрат или само карбамид като източник на азот (страница 5). Култивирането е извършено при температура 25°C (*Scenedesmus* sp.) и 30°C (*Chlorella vulgaris*) и НСИ (132  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Културите са продухвани непрекъснато с въздух, обогатен с 2% CO<sub>2</sub>.

#### 4.1. Изоензимни профили и ензимни активности при *Chlorella vulgaris* R-06/2

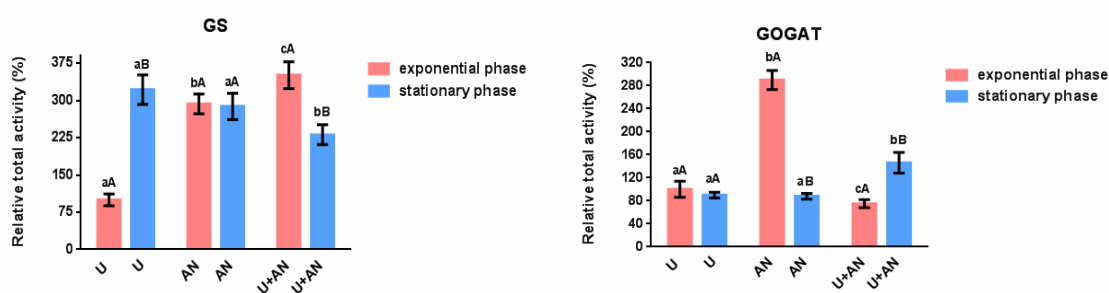
В клетъчните екстракти на *Chlorella vulgaris* R-06/2, култивирана в трите варианта на хранителна среда, глутамин синтетазата (GS) е представена от две дифузни ивици, обозначени с **a** и **b** (Фигура 9А).

Четири изоформи (**a-d**) на глутамат синтазата (GOGAT) на *Chlorella vulgaris* R-06/2 се наблюдават върху геловите след нативна PAGE и последващо оцветяване (Фигура 9А).

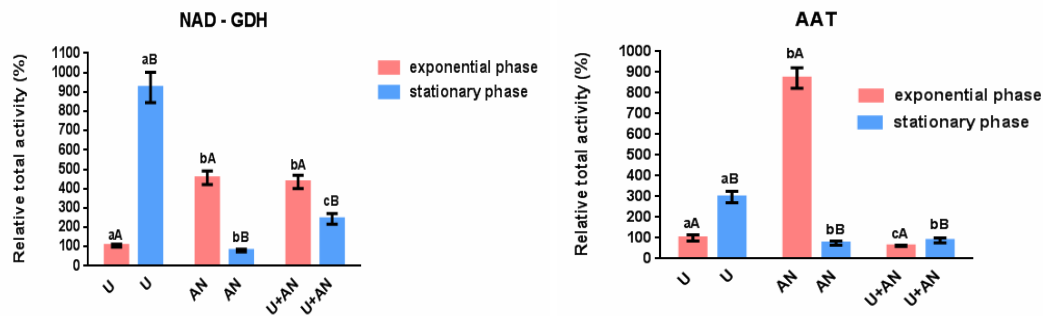
При всички култивационни условия се наблюдават по една ивица с NAD-зависима глутамат дехидрогеназна (NAD-GDH) и по една ивица с аспартат аминотрансферазна (ААТ) активност (Фигура 9А).



A







## В

**Фигура 9.** Изоензимен профил (А) и промени в относителната обща активност на глутамин синтетазата (GS) и глутамат синтазата (GOGAT) и в активността на NAD-зависимата глутамат дехидрогеназа (NAD-GDH) и аспарат-аминотрансферазата (AAT) (В) на *Chlorella vulgaris* R-06/2 в отговор на източника на азот и фазата на растеж. В (А), изоензимите на GS и GOGAT са означени с букви по реда на нарастващата им електрофоретична подвижност в нативен 10% полиакриламиден гел. Във всяка ямка е нанесено еднакво количество белтък (9 µg). Ямки 1 и 2 – карбамид (U), 3 и 4 – амониев нитрат (AN), 5 и 6 – карбамид+амониев нитрат (U+AN). 1, 3 и 5 – проби от експоненциална фаза на растеж; 2, 4 и 6 - проби от стационарна фаза. В (В), стойностите са представени спрямо ензимната активност на водораслото, расло в среда с карбамид до експоненциална фаза, която условно е приета за 100%. Средните стойности с различни малки букви се различават значително ( $P < 0.05$ ) между азотните източници за специфична фаза на растеж; различните главни букви показват значителна разлика ( $P < 0.05$ ) за специфичен източник на азот между експоненциална и стационарна фаза.

Общата глутамин синтетазна активност е най-слабо изразена в културата, експоненциално растяща в среда с карбамид (**Фигура 9В**). В стационарна фаза обаче, активността нараства с 220%. При отглеждане на *Chlorella vulgaris* R-06/2 в среда с амониев нитрат, GS-та активност е относително висока и не се променя с времето на култивиране. При използване на стандартната среда, активността на GS е най-висока в сравнение с другите две експоненциално растящи култури и най-ниска сред културите в стационарна фаза на растеж.

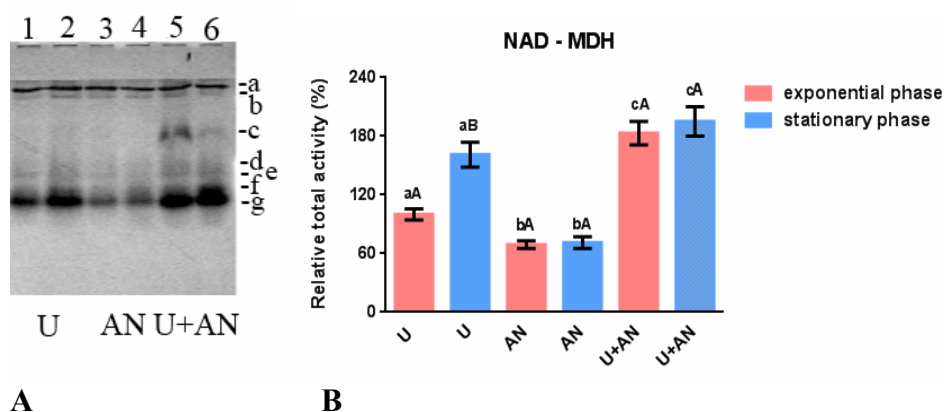
Култивирането на среда с амониев нитрат има силно стимулиращ ефект върху активността на глутамат синтазата, но само в експоненциална фаза на растеж (**Фигура 9В**). Общата ензимна активност на водораслото, отглеждано на среда с карбамид не се повлиява значително от фазата на растеж, но изоформите **c** и **d** имат по-висока активност в експоненциална фаза. При по-продължително отглеждане на *Chlorella vulgaris* R-06/2 в стандартната среда, активността на GOGAT се увеличава приблизително два пъти в сравнение с експоненциална фаза.

NAD-зависимата глутамат дехидрогеназа проявява най-висока активност при култивиране на водораслото в среда с карбамид до стационарна фаза, докато в експоненциална фаза на растеж в същата среда тя е около 9 пъти по-ниска (**Фигура 9В**). При използване на средата с амониев нитрат и стандартната среда, активността на NAD-GDH е по-висока в пробите от експоненциална, в сравнение с тези от стационарна фаза. Най-ниска е активността на пробата от *Chlorella vulgaris* R-06/2, култивирана в среда с амониев нитрат до стационарна фаза.

Активността на ензима AAT е най-висока при отглеждане на *Chlorella vulgaris* R-06/2 в среда с амониев нитрат до експоненциална фаза на растеж (**Фигура 9В**).

Аспартат-аминотрансферазата е по-активна в средата с карбамид в сравнение със стандартната среда и през двете фази на растеж, и в културата в стационарна фаза сравнена с експоненциална фаза и при двете среди.

При разглеждане на изоензимния профил на NAD-зависимата малат дехидрогеназа (NAD-MDH) на *Chlorella vulgaris* се установява наличието на 6 конститутивни и една индуцируема изоформа (Фигура 10А). Индуцируемата изоформа **c** се наблюдава при използване на стандартната среда, като активността ѝ е 3 пъти по-висока в експоненциална в сравнение със стационарна фаза на растеж. Най-слаба е относителната обща активност на ензима в пробите, получени при култивирането на водораслото в среда с амониев нитрат (Фигура 10В). От всички изоформи, с най-висока интензивност са **g** и **a**. Интензитетът (активността) на изоформа **g** се променя с промяната на култивационните условия и най-силно повлиява общата ензимна активност, докато активността на изоформа **a** варира слабо. При използване на среда с карбамид, например, интензивността на ивицата **g** и общата NAD-MDH активност са с около 50% по-високи в стационарна в сравнение с експоненциална фаза на растеж.

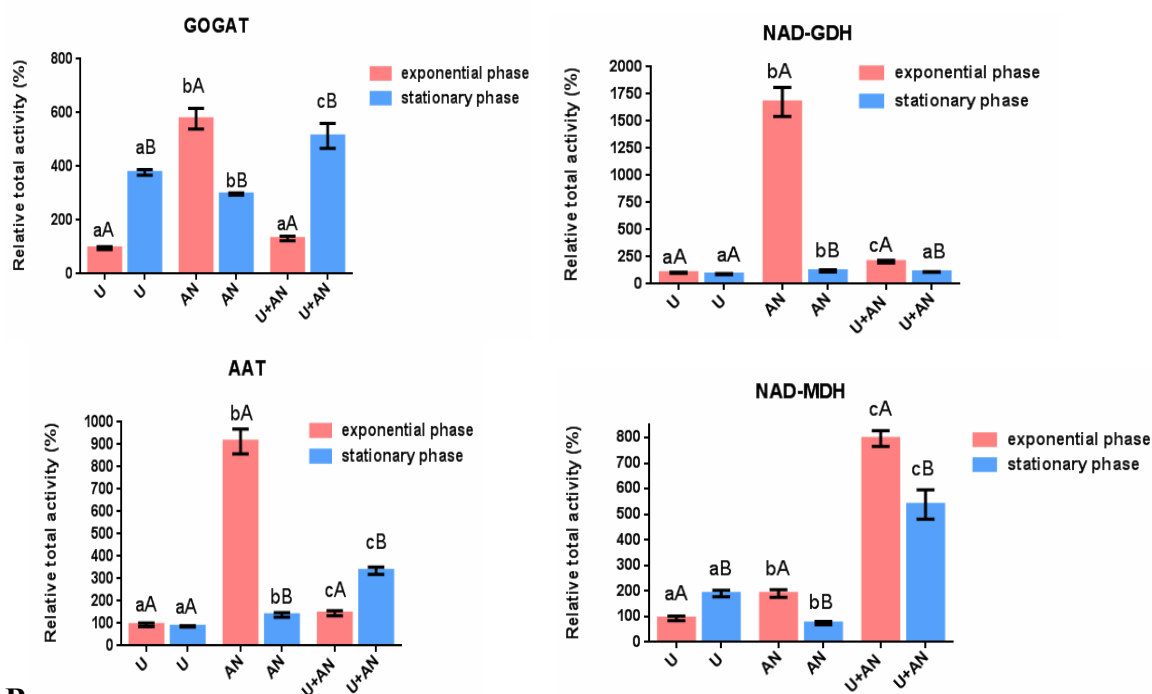
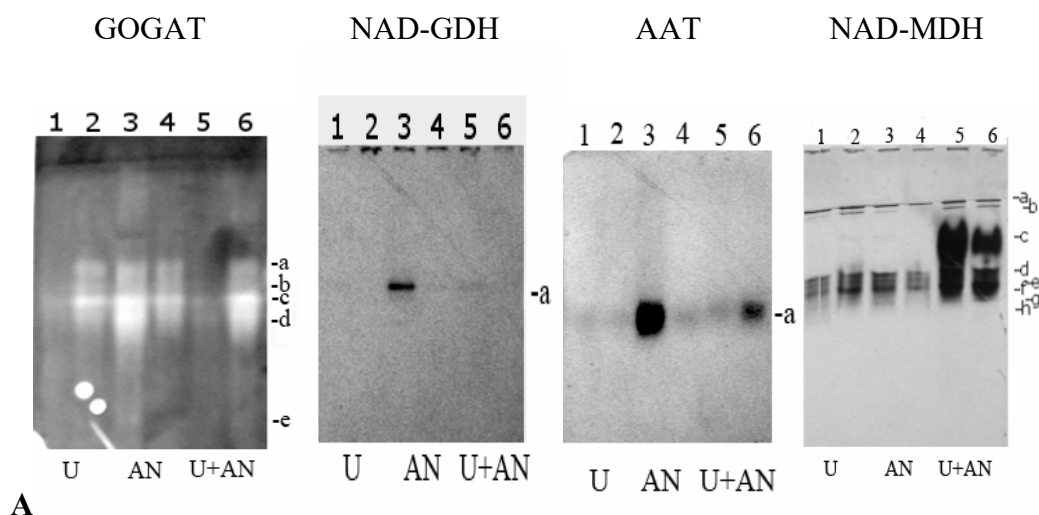


**Фигура 10.** Изоензимен профил (А) и относителна обща активност на NAD-зависимата малат дехидрогеназа (NAD-MDH) (В) на *Chlorella vulgaris* R-06/2, култивирана в среди с различен азотен източник. В (А), 1 и 2 – карбамид (U), 3 и 4 – амониев нитрат (AN), 5 и 6 – карбамид+амониев нитрат (U+AN). 1, 3 и 5 – проби от експоненциална фаза на растеж; 2, 4 и 6 - проби от стационарна фаза. С букви (**a-g**) са означени ивиците с NAD-MDH активност по реда на нарастващата им електрофоретична подвижност. Във всяка ямка е нанесено еднакво количество белтък (9 µg). В (В), стойностите са представени спрямо общата NAD-MDH активност на водораслото, расло в среда с карбамид до експоненциална фаза, която условно е приета за 100%. Средните стойности с различни малки букви се различават значително ( $P < 0.05$ ) между азотните източници за специфична фаза на растеж; различните главни букви показват значителна разлика ( $P < 0.05$ ) за специфичен източник на азот между експоненциална и стационарна фаза.

#### 4.2. Изоензимни профили и ензимни активности при *Scenedesmus* sp. BGP

При *Scenedesmus* sp. BGP се наблюдават четири ясно разграничими ивици с GOGAT активност (Фигура 11А, a-d) и осем ивици с NAD-зависима MDH активност (Фигура 11А, a-h) при всички култивационни условия. NAD-зависимата глутамат дехидрогеназа и ААТ са представени от по една ивица със съответната активност (Фигура 11А).





**В**  
**Фигура 11.** Изоензимен профил (**А**) и промени в относителната обща активност на GOGAT и NAD-MDH и в активността на NAD-GDH и AAT (**В**) на *Scenedesmus* sp. BGP, култивиран в среди с различен източник на азот. В (**А**), 1 и 2 – карбамид (U), 3 и 4 – амониев нитрат (AN), 5 и 6 – карбамид+амониев нитрат (U+AN). 1, 3 и 5 – проби от експоненциална фаза на растеж; 2, 4 и 6 - проби от стационарна фаза. С букви са означени ивиците с ензимна активност по реда на нарастващата им електрофоретична подвижност. Във всяка ямка е нанесено еднакво количество белтък (13 µg). В (**В**), стойностите са представени спрямо общата ензимна активност на водораслото, расло в среда с карбамид до експоненциална фаза, която условно е приета за 100%. Средните стойности с различни малки букви се различават значително ( $P < 0.05$ ) между азотните източници за специфична фаза на растеж; различните главни букви показват значителна разлика ( $P < 0.05$ ) за специфичен източник на азот между експоненциална и стационарна фаза.

Най-висока обща GOGAT активност проявява водораслото, отгледано в среда

с амониев нитрат до експоненциална фаза и в стандартната среда до стационарна фаза (**Фигура 11В**). Това са и пробите, при които се наблюдава пета, бързо движеща се, но слаба ивица **e**. Пробите от водораслото, култивирано до експоненциална фаза в среда с карбамид и в стандартната среда са с най-слаба GOGAT активност.

Промените в ензимната активност на NAD-GDH и ААТ на *Scenedesmus* sp. BGP с промяна на култивационните условия са доста сходни. Като цяло, активността на двата ензима е ниска. Забележително висока е активността им в пробата получена от водораслото, расло в среда с амониев нитрат, но само в експоненциална фаза (**Фигура 11В**). В стационарна фаза на растеж се наблюдава значителен спад в активността. И при двата ензима, в средата с карбамид се регистрира най-ниска активност, която не се повлиява от времето на култивиране ( $P > 0.05$ ). Само на стандартната среда, активността на NAD-GDH в стационарна фаза намалява значително ( $P < 0.05$ ), докато активността на ААТ е над 2 пъти по-висока в сравнение с тези в експоненциална фаза (**Фигура 11В**).

Относителната обща NAD-MDH активност е най-висока в културите отглеждани на стандартната среда, поради най-високата интензивност на техните изоформи **c**, **d** и **f**. В културите отгледани в среда с карбамид, активността на MDH е около 2 пъти по-висока в стационарна, отколкото в експоненциална фаза. Обратната зависимост от фазата на растеж се наблюдава при *Scenedesmus* sp. BGP, отглеждан в среда с амониев нитрат (**Фигура 11В**).

За отбелязване е, че изоензимните профили на изследваните ензими не се променят с промяна на култивационните условия, с изключение на NAD-MDH при *Chlorella vulgaris* R-06/2 и GOGAT при *Scenedesmus* sp. BGP. И при двете водорасли обаче, изборът на азотен източник в средата, както и времето на култивиране значително повлияват активността на изследваните ензими.

Сравнителният анализ на промените в ензимните активности показва, че:

1. Отговорите на ензимите към едни и същи култивационни условия са щам-специфични. Например, *Chlorella vulgaris* R-06/2, расла до експоненциална фаза в стандартната среда има най-високите активности на GS, NAD-MDH и NAD-GDH в комбинация с най-слабо активни ААТ и GOGAT, в сравнение с културите, отгледани в среда с карбамид и среда с амониев нитрат. При *Scenedesmus* sp. BGP, същите култивационни условия водят до най-активна NAD-MDH и средно високи активности на NAD-GDH, ААТ и GOGAT.

2. Не се наблюдава пряка връзка между нивата на активност на метаболитните ензими и скоростта на растеж и натрупването на биомаса от водораслите. Например, културата на *Scenedesmus* sp. BGP, отглеждана на среда с амониев нитрат до експоненциална фаза има най-висока активност на GOGAT, GDH, ААТ и средно висока активност на NAD-MDH, докато при използване на средата с карбамид, в експоненциално растящата култура на *Scenedesmus* sp. BGP активностите и на четирите ензима са най-ниски от всички изследвани култивационни условия. Въпреки разликите в отговорите на метаболитните ензими към карбамид спрямо амониев нитрат, двата азотни източника осигуряват приблизително еднакъв добив на биомаса.

3. Регулацията на метаболитните ензими зависи от фазата на растеж. Например, в стационарна фаза на растеж в средата, съдържаща карбамид активностите на GS, NAD-GDH, ААТ и NAD-MDH на *Chlorella vulgaris* R-06/2 са значително по-високи в сравнение с тези в експоненциална фаза.

4. И при двете изследвани зелени водорасли, активността на NAD-MDH е най-висока при култивирането им в среда със смес от двата азотни източника и през двете фази на растеж, което вероятно е свързано с по-големите енергийни нужди на тези клетки.

Активностите на изследваните метаболитни ензими на *Chlorella vulgaris* R-06/2 и *Scenedesmus* sp. BGP се променят в отговор на смяната на азотния източник и с възрастта на културата. Тези промени могат да бъдат свързани с взаимодействията между нитрат и амоний или нитрат, амоний и карбамид и техния ефект върху скоростта на поглъщане на N, капацитета на нитратните, амониеви и карбамидни транспортни системи и активността на нитрат редуказата, нитрит редуказата и АТФ-уреа амидолиазата. Разликите в размера на ендогенния клетъчен пул на амоний и на междинни метаболити като глутамат и алфа кетоглутарат в зависимост от източника на N, както и фазата на растеж, също могат да имат значително влияние върху активността на изследваните ензими.

Проведени и описани са редица по-ранни проучвания върху това как се променят отговорите на микроводорасловите метаболитни ензими към различни източници на N, но всички се отнасят до замяната на нитрат в хранителната среда с амоний или обратно (Tischner and Lorenzen, 1980; Ahmad and Hellebust 1984; Ahmad and Hellebust 1993; Shatilov et al., 1978; Moyano et al., 1995; Muñoz-Blanco et al., 1989 и рядко с карбамид (Muñoz-Blanco et al., 1988). Моделни организми в тези изследвания са *Chlorella* и *Chlamydomonas*. Техните ензими GS, GOGAT, GDH и ААТ са най-добре характеризирани по отношение на кинетични свойства, промени в изоензимните профили и нивата на активност.

*Резултатите от тази група изследвания показват метаболитната пластичност на двата щама при промяна на азотния източник в хранителната среда и времето на култивиране. Способността на Chlorella vulgaris R-06/2 и Scenedesmus sp. BGP да включват различни регулаторни механизми в отговор на карбамид, амониев нитрат или смес от двата азотни източника, както и в зависимост от фазата на растеж, осигурява поддържането на ефективно функциониране на метаболитните и антиоксидантни ензими, и води до нееднакъв, но добър растеж на водораслите.*

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Щамовете, потенциални участници в масово производство, трябва да притежават определени физиологични, биохимични и технологични характеристики, по-важните от които са – да бъдат бързорастящи, високопродуктивни, устойчиви към промени в условията на култивиране, да имат балансиран биохимичен състав.

Резултатите от проучване на физиолого-биохимични характеристики на *Scenedesmus* sp. BGP разкриват редица биотехнологични предимства на този нов български щам зелено микроводорало. Преди всичко, щамът е сред най-добрите производители на биомаса, белтъци, въглеhidрати и липиди от изследваните видове/щамове от род *Scenedesmus*. Нещо повече, ценните компоненти на биомасата се натрупват в условия (температура, осветяване и азотен източник в хранителната среда), благоприятни за растежа, а не в отговор на стрес. Сравнително ниската оптимална температура на растеж, високата толерантност към по-ниските температури, предпочитанието към по-висок интензитет на светлината и способността за поддържане на значителен растеж и балансиран биохимичен състав в широк температурен диапазон показват, че *Scenedesmus* sp. BGP е перспективен щам, подходящ за широкомащабно култивиране. При използване на среди с един азотен източник (амониев нитрат или карбамид), количеството на въглеhidрати, белтъци и липиди в биомасата на водораслото е по-високо отколкото в среда със смес от двата азотни източника, като растежът е най-добър в среда с карбамид. От практическа гледна точка използването на щам с висока толерантност към температурата, особено по-ниски температури, и с предпочитание към карбамид е от решаващо значение за подобряване на производителността при намаляване на разходите за култивиране, тъй като не се налага подгряване, а карбамидът е евтин и достъпен азотен източник. Допълнително предимство на средата с карбамид е, че след отделяне на биомасата, културалната течност може да се използва за напояване на културни растения без ограничения, тъй като карбамидът се хидролизира напълно.

Биотехнологичният потенциал на *Chlorella vulgaris* R-06/2 е представен до голяма степен в публикацията на Гъчева и Пиларски (Gacheva & Pilarski, 2008). Според авторите, температурният оптимум на *Chlorella vulgaris* R-06/2 е 36°C, но водораслото запазва висока производителност в широк температурен обхват (26-39°C). От особен интерес за масово открито отглеждане на щама са посочени неговата устойчивост към високи светлинна интензивност, температура и солева концентрация на хранителната среда; относителната стабилност на химичения му състав (белтъци 39-53%, въглеhidрати 20-26%, липиди 15-30% и пигменти 1,5-4%), който е в границите на изискването за открито култивиране; както и бързото възстановяване на растежа на водораслото след отстраняване на влиянието на стресови фактори (температура от 51°C за 4 часа и 20 дневен глад). В допълнение, настоящите изследвания разкриват толерантността на *Chlorella vulgaris* R-06/2 към промяна на източника на азот в хранителната среда. Щамът ефективно използва азот от карбамид, амониев нитрат или смес от двете за натрупване на биомаса, въпреки че скоростта на асимилация на двете азотни съединения, прилагани едновременно, е по-ниска. Това позволява избор на азотния източник според целите на култивиране. При кратковременно култивиране (4 дни), средите само с карбамид или само с амониев нитрат осигуряват по-бърз растеж на водораслото и по-висок добив на белтъци, липиди, въглеhidрати и пигменти в сравнение със средата с два източника на азот. Средата с два азотни източника е по-подходяща за получаване на най-голямо количество биомаса, белтъци и пигменти, но при по-продължително култивиране (20 дни). При широкомащабно отглеждане на *Chlorella vulgaris* R-06/2 за производство на биомаса за различни полезни приложения,

карбамидът би бил най-подходящият избор по отношение на икономическа рентабилност.

Проведените изследвания са съобразени с нуждите на откритото масово култивиране на микроводорасли. Получените резултати могат да послужат в практиката на биотехнологията за производство на водораслова биомаса и продукти от нея; те маркират продуктивните възможности на двата изследвани щама, насоката на метаболизма им при разнообразни температурни и светлинни въздействия, концентрация на хранителната среда и/или азотен източник.

## ИЗВОДИ

1. *Scenedesmus* sp. BGP има сравнително ниска оптимална температура за растеж, поддържа висока продуктивност в широк температурен диапазон при две нива на осветяване и запазва жизнеността си при екстремна температура от 42°C.

2. Най-голямо количество биомаса и нейните компоненти се получават при отглеждане на *Scenedesmus* sp. BGP при по-високата светлинна интензивност и оптималната температура (биомаса, белтъци и липиди) или близка до оптималната температура (въглехидрати).

3. От приложените стойности на начална плътност на културата, при 0.8 g L<sup>-1</sup> се постига най-висока продуктивност на биомаса на *Scenedesmus* sp. BGP.

4. Промяната на азотния източник и концентрацията на солите в хранителната среда при *Scenedesmus* sp. BGP и на азотния източник при *Chlorella vulgaris* R-06/2, както и времето на култивиране при двата щамове, повлиява значително растежа и биохимичния състав на водораслите, което може да се използва за повишаване на добива от биомаса и нейни компоненти.

5. Промените в активността на изследваните метаболитни и антиоксидантни ензими на *Chlorella vulgaris* R-06/2 и *Scenedesmus* sp. BGP в отговор на смяната на азотния източник в хранителната среда са щам-специфични и зависят от фазата на растеж. Добрият растеж на двете водорасли е указание за ефективно функциониране на изследваните ензими при всяко от приложените условия на култивиране.

6. От изследваните, карбамидът е най-подходящият азотен източник в хранителната среда поради по-ефективното му (от *Scenedesmus* sp. BGP) или по-бързо (от *Chlorella vulgaris* R-06/2) усвояване, неговата достъпност и сравнително ниска пазарна цена.

7. Качественият състав на биомасата на *Scenedesmus* sp. BGP е количествено балансиран и е в границите на изискването за открито култивиране. С постигнатия максимален добив на биомаса от 8.9 g L<sup>-1</sup>, на белтъци от 2.54 g L<sup>-1</sup>, на въглехидрати – 2.45 g L<sup>-1</sup> и на липиди – 1.8 g L<sup>-1</sup>, *Scenedesmus* sp. BGP е сред изследваните видове/щамове от р. *Scenedesmus*, най-добри продуценти на биомаса и нейни ценни компоненти.

8. Съдържанието на въглехидрати в биомасата на българския щам на *Chlorella vulgaris* (41-47.5% от АСВ) е по-високо от средните стойности за вида.

9. Комплексните физиолого-биохимични характеристики на *Scenedesmus* sp. BGP и *Chlorella vulgaris* R-06/2 разкриват големия биотехнологичен потенциал на двата български щамове.

## П Р И Н О С И

1. Определени са оптималната температура за растеж (25°C) и границите на температурна толерантност (16-32°C) на *Scenedesmus* sp. BGP при две нива на осветяване.

2. За първи път са характеризирани изоензимният профил и промените в активността на основни антиоксидантни ензими (SOD, CAT, GR и GPOD) на *Scenedesmus* sp. BGP в отговор на различни култивационни температури, при две светлинни интензивности. Разкрито е участието на ензимите и на техни специфични изоформи в механизмите на преодоляване на неблагоприятни условия, както и на нискотемпературната толерантност на щама.

3. Установени са условия на култивиране на *Scenedesmus* sp. BGP и *Chlorella vulgaris* R-06/2, при които се получава по-голям добив на биомаса, белтъци, въглехидрати, липиди и пигменти, което е от несъмнен биотехнологичен интерес.

4. Потвърдено е, че изборът на азотен източник повлиява видово/щам-специфично растежа и биохимичния състав на водораслите.

5. Установена е способността на *Scenedesmus* sp. BGP и *Chlorella vulgaris* R-06/2 да усвояват карбамид, амониев нитрат и смес от двата азотни източника и карбамидът аргументирано е предложен като най-подходящ избор при широкомащабно култивиране на двете водорасли за производство на биомаса за различни полезни приложения.

6. За първи път е характеризиран изоензимният профил на метаболитни ензими свързващи азотния и въглеродния метаболизъм (GS/GOGAT, NAD/NADP-GDH, AAT, NAD/NADP-MDH), протеази и естерази на *Scenedesmus* sp. BGP и *Chlorella vulgaris* R-06/2 и са установени щам-специфични промени в активността на тези ензими в отговор на различни източници на азот в средата и възрастта на културата.

7. Разкрити са ценни биотехнологични качества на *Scenedesmus* sp. BGP, а биохимичните характеристики на *Chlorella vulgaris* R-06/2 са разширени и обогатени. Двата български щама са подходящи за широкомащабно култивиране, с отлична перспектива за приложение в биотехнологичната практика.

## **Публикации във връзка с темата на дисертацията и забелязани цитати по тях**

1. Vasileva I., Marinova G., Gigova L. 2015. Effect of nitrogen source on the growth and biochemical composition of a new Bulgarian isolate of *Scenedesmus* sp. *J BioSci Biotechnol*, SE/ONLINE: 125-129.

### **Цитати:**

1. Al-Zuhair S., Ashraf S., Al Darmaki N., Battah S., Svistunenko D., Reeder B., Stanway G., Chaudhary A. 2016. Enzymatic pre-treatment of microalgae cells for enhanced extraction of proteins. *Eng.Life Sci.*, Vol. 17(2), pp. 175 – 185.
  2. Дмитрович НП, Гаргун МА, Жовнерик ОЮ, Молчанович ЕА. 2017. Влияние условий культивирования на динамику биомассы *Scenedesmus acutus* Meyen. Научный потенциал молодежи – будущему Беларуси: материалы XI международной молодежной научно-практической конференции, УО "Полесский государственный университет", г. Пинск, 7 апреля 2017 г. Ч.1: 289-291, Издатель Пинск: Полесский государственный университет.
  3. Ghosh A., Khanra S., Mondal M., Halder G., Tiwari O.N., Bhowmick T.K., Gayen K. 2017. Effect of macronutrient supplements on growth and biochemical composition in photoautotrophic cultivation of isolated *Asterarcys* sp. (BTA9034). *Energ Conv Man*, Vol. 149, pp. 39 – 51.
  4. Khatoun H., Haris H., Abdu Rahman N., Zakira M.N., Begum H., Mian S. 2018. Growth, Proximate Composition and Pigment Production of *Tetraselmis chuii* Cultured with Aquaculture Wastewater. *J. Ocean Univ. China*, Vol. 17(3): 641- 646.
  5. Eida M. F., Darwesh O. M., Matter I. A. 2018. Cultivation of oleaginous microalgae *Scenedesmus obliquus* on secondary treated municipal wastewater as growth medium for biodiesel production. *J Ecol Eng*, 19(5): 38-51.
  6. Sajjadi B., Chen W. Y., Raman A. A., Ibrahim S. 2018. Microalgae lipid and biomass for biofuel production: A comprehensive review on lipid enhancement strategies and their effects on fatty acid composition. *Ren & Sust Energ Rev*, 97: 200-232.
  7. Da Fontoura J. T. 2017. Microalgae growth in tannery effluent: nutrient removal, viability of biodiesel production and use of residual biomass. PhD thesis. Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
  8. Nadaf M., Nizam A. A., Okkou H. 2018. Effect of some growth conditions on the biomass carbohydrates of *Scenedesmus dimorphus* isolated from Syrian fresh water. *Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series*, 39 (4): 105-119.
2. Vasileva I., Marinova G., Gigova L. Growth and Antioxidant Enzymes Responses of *Scenedesmus* sp. BGP (Chlorophyceae) to Cultivation Temperature and Irradiance. *Oxid Commun*, Приета за печат: 2019, IF: 0.489 (WoS, 2015).

### **Участия в научни форуми във връзка с темата на дисертацията**

I. Vasileva I., G. Marinova, L. Gigova. Effect of nitrogen source on the growth and biochemical composition of a new Bulgarian isolate of *Scenedesmus* sp. Second National Youth Conference “Biological sciences for a better future”, October 30-31, 2015, Plovdiv, Bulgaria.

I. Vasileva I., J. Ivanova, G. Marinova. Effect of temperature+light on the growth and biochemical composition of newly isolated Bulgarian strain *Scenedesmus* sp. BGP. Seventh international conference of young scientists. June 15-16<sup>th</sup>, 2017, Plovdiv, Bulgaria.

I. Vasileva I., J. Ivanova, L. Gigova. Effect of the nitrogen source in the nutrient medium on the isoenzyme profiles of *Scenedesmus* sp. BGP and *Chlorella vulgaris* R-06/2. Seventh international conference of young scientists. June 15-16<sup>th</sup>, 2017, Plovdiv, Bulgaria.

### **Ръководител на проекти във връзка с дисертационния труд**

ДФНП-207/16.05.2016 по Програма за подпомагане на младите учени в БАН на тема “Физиолого-биохимично характеризирание на новоизолирания български микроводораслов щам *Scenedesmus* sp. BGP с цел оценка на биотехнологичния му потенциал”. Научен консултант: гл. ас. д-р Юлиана Иванова.