



БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ

ИНСТИТУТ ПО ФИЗИОЛОГИЯ НА РАСТЕНИЯТА И ГЕНЕТИКА

ЛАБОРАТОРИЯ „ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА И ПРИЛОЖНА АЛГОЛОГИЯ“

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация за присъждане на
образователна и научна степен „доктор“ Професионално направ-
ление 4.3 Биологически науки Научна специалност „Биохимия“

Сравнителен анализ на биологичната активност при микроводораслите *Porphyridium aerugineum* и *Chlorella vulgaris*

ВЕРОНИКА РАДОМИРОВА ДЕЛЕВА

Научен ръководител:
доц. д-р Юлиана Иванова

София, 2026

Дисертационният труд е написан на стандартни машинописни страници и съдържа следните раздели: **Увод** – 2 стр.; **Литературен обзор** – 31 стр.; **Цел и задачи** – 1 стр.; **Материали и методи** – 18 стр.; **Резултати и обсъждане** – 70 стр.; **Изводи** – 2 стр.; **Приноси** – 2 стр. Включени са 51 **фигури** и 12 **таблици**. В литературната справка са отразени 175 **заглавия**. Експерименталната работа е осъществена в лаборатория “Експериментална и приложна алгология” и в микробиологичната лабораторията на фирма РОМБ ООД.

Дисертационният труд е обсъден на разширено заседание на лаборатория „Експериментална и приложна алгология“, Институт по физиология на растенията и генетика – БАН, проведено на 23.04.2026г. от 10:00 часа и насрочен за защита пред научно жури, сформирано със заповед на Директора на ИФРГ-БАН.

Научно жури:

- 1. доц. д-р Людмила Симова-Стоилова**
- 2. проф. Пенка Мончева**
- 3. доц. д-р Мария Генева**
- 4. доц. д-р Ганка Чанева**
- 5. проф. Людмила Кабаиванова-Миланова**

Защитата на дисертационния труд ще се състои наот ... часа в сградата на ИФРГ-БАН.

ВЪВЕДЕНИЕ

Интензивното използване на синтетични минерални торове през последните десетилетия значително повиши селскостопанските добиви, но доведе до редица екологични и климатични проблеми - деградация и загуба на органично съдържание в почвите, замърсяване на водни екосистеми чрез отмиване на нитрати и фосфати, емисии на парникови газове и влошаване на биологичното разнообразие. Тези предизвикателства изискват преминаване към практики, които повишават ефективността на храненето на растенията и същевременно намаляват екологичния отпечатък на селското стопанство. За да се намалят негативните ефекти от конвенционалното торене, науката и индустрията развиват природосъобразни продукти - сред които биостимулантите и биоторовете. Биостимулантите действат чрез стимулиране на физиологични и метаболитни процеси в растенията (напр. подобряване на усвояването на хранителни вещества и повишаване на устойчивостта към абиотичен стрес), без основната им функция да е пряко доставяне на хранителни елементи. Биоторовете, от своя страна, осигуряват или улесняват усвояването на хранителни вещества и/или подобряват почвеното здраве чрез въвеждане на органична биомаса или живи микроорганизми. Това разграничение е важно при класификацията и регулацията на продуктите. В Европейския съюз Регламент (EU) 2019/1009 (FPR) въвежда ясна нормативна рамка за „EU fertilising products“, като за пръв път дефинира и регулира продуктови категории, включително биостимуланти, на общоевропейско ниво. Регламентът поставя функционални изисквания и критерии за безопасност и етикетирание, което има пряко влияние върху разработването, комерсиализацията и използването на биостимуланти и биоторове в ЕС. Това прави разграничението между „доставка на хранителни вещества“ и „стимулиране на физиологични процеси“ не само научно, но и регулаторно релевантно (European Parliament & Council, 2019).

Микроводораслите са обещаващ ресурс в устойчивото земеделие поради бързия си растеж, високото съдържание на биомаса и богатия набор от биохимични метаболити (пигменти, аминокиселини, полизахариди, фитохормони, вещества с фитохормон-подобно действие и антиоксиданти). Те могат да се използват по два принципно различни начина в селското стопанство - директно като биомаса за подобряване на почвените

свойства и доставка на хранителни елементи или като екстракти, богати на биологично активни вещества за стимулиране на растителните физиологични процеси и подобряване на устойчивостта към стрес. Скорошни систематични анализи показват многобройните положителни ефекти на микро- и макроводораслите върху покълването, началния растеж, устойчивостта към абиотичен стрес и почвеното здраве, но също така посочват необходимостта от стандартизирани методи за производство, приложение и оценка на ефектите (Parmar et al., 2023).

Настоящата дисертация изследва биостимулиращия потенциал на два щамa микроводорасли от видовете *Chlorella vulgaris* и *Porphyridium aerugineum* — като съчетава култивиране, биохимичен анализ и експерименти със семена и растения при различни концентрации и методи на приложение. Основната цел е да се оцени и сравни ролята на тези видове, както като източник на биостимулиращи молекули (екстракти/филтрати), така и като потенциални биоторове при директно приложение на биомаса, с оглед на съвременните регулаторни изисквания и устойчивото земеделие.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия дисертационен труд е да се извърши сравнителна оценка на биологичната активност на шамове *Porphyridium aerugineum* HINDAK 1983/2 и *Chlorella vulgaris* RJ1 въз основа на техния биохимичен профил, антиоксидантна активност и ефекта им върху тестови растения, като по този начин се определи потенциалът им за приложение като микроводораслови биостимуланти и/или биоторове.

Задачи:

1. Изолиране, идентифициране и селектиране на шам от вида *C. vulgaris*.
2. Избор на оптимална хранителна среда и условия за култивиране на новоизолирания шам *C. vulgaris*.
3. Култивиране и охарактеризиране на шамовете *P. aerugineum* HINDAK 1983/2 и *C. vulgaris* RJ1.
 - 3.1. Морфологично охарактеризиране.
 - 3.2. Биохимично профилиране.
 - 3.3. Оценка на антиоксидантната активност.
4. Получаване на различни експериментални формулировки от изследваните микроводорасли
5. Определяне на оптимални параметри за високоефективна дезинтеграция на микроводорасловите клетки от двата вида.
6. Оценка на ефекта на различните експериментални формулировки върху кълняемостта и ранното развитие на *Lactuca sativa*.
7. Проследяване на влиянието на биомасата, ендометаболитите и екзометаболитите на *P. aerugineum* HINDAK 1983/2 и *C. vulgaris* RJ1 върху растежа и физиолого-биохимичния статус на *Solanum lycopersicum*.
8. Сравнителна оценка на приложния потенциал на двата вида микроводорасли.

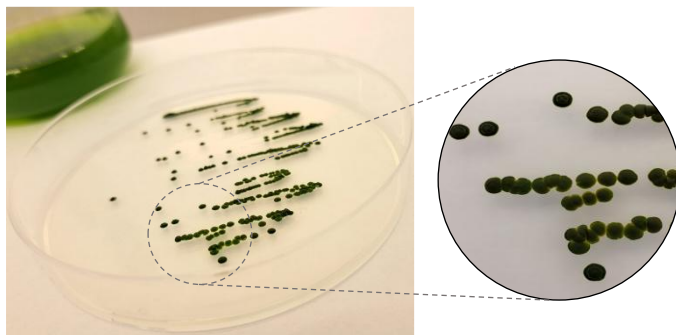
МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Изолиране на нов микроводораслов щам.
2. Идентификация.
3. Подбор на микроводораслов щам за сравнителен анализ и потенциална комплементарност.
4. Хранителни среди.
5. Методи и условия на култивиране на микроводорасловите култури:
 - 5.1 Култивиране в колби.
 - 5.2 Култивиране в модифицирани системи.
 - 5.3 Култивиране в специализирани съоръжения на лаборатория „Експериментална и приложна алгология“.
 - 5.4 Дълбочинно култивиране в биореактор с механично разбъркване.
6. Методи за анализ на култивационните процеси.
7. Биохимични анализи:
 - 7.1 Определяне на количеството белтък по метода на Lowry (1951).
 - 7.2 Определяне на съдържанието на въглехидрати (Фенол-серен метод по Dubois et al. (1956)).
 - 7.3 Анализ на продуцираните липиди (Петков (1990)).
 - 7.4 Анализ на продуцираните екзополизахариди.
 - 7.5 Анализ за наличието на екзоензими.
8. Дезинтеграция на микроводорасловите клетки
9. Получаване на експериментални формулировки от микроводораслови култури.
10. Антиоксидантна активност – полифеноли, флавоноиди, FRAP, ABTS
11. HPLC анализ за количествено определяне на фитохормони (ThermoScientific Co, САЩ) .
12. Анализ на кълняемостта и прорастването при семена (Rupawalla et al., 2022)
13. In vitro анализ на физиолого-биохимичния ефект върху тест растения *Solanum lycopersicum*
14. Статистическа обработка

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Изолиране, идентифициране и селектиране на шам от вида *C. vulgaris*.

От смесена микроводораслова проба са изолирани 3 щама микроводорасли, като по морфологични признаци наблюдавани на светлинен микроскоп при 1000x увеличение са диференцирани 2 вида от род *Chlorella* и един вид от род *Scenedesmus*. Микроводораслото от род *Chlorella* (Фиг.1) с по-бърз растеж е избрано за последваща идентификация и видовата му принадлежност като *C. vulgaris* е потвърдена от Лабораторията по Генетика към Института по физиология на растенията и генетика - БАН. На новоизолирания шам е дадено означението RJ1, с цел отдиференцирането му от други налични изолати на вида *Chlorella vulgaris*.



Фиг. 1. Изтощаващ шрих на *Chlorella vulgaris* RJ1 върху среда BG-11

2. Морфологично охарактеризиране на изолатите

2.1. Екстензивно култивиране на *Chlorella vulgaris* RJ1

С цел намножаване на минималното количество получена аксенична култура от *C. vulgaris* RJ1, в система PPBR1 (Фиг.2) с постоянна температура от 28°C, 24h аериране с въздух (с концентрация на CO₂ от 0.05 – 0.10%) и хранителна среда BG-11 за период от 4 седмици е постигната 250ml микроводораслова култура с АСВ от 4,8 g/l. Това количество е използвано за определяне на оптималната хранителна среда за култивиране на *C. vulgaris* RJ1.



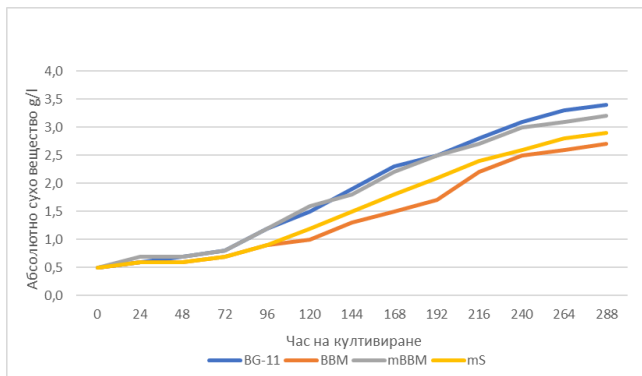
Фиг.2. Първи прототип на фотобиореактор - PPBR1, използван за размножаване на *Chlorella vulgaris* RJ1.

Получените резултати показват добра адаптация на културата към използваните култивационни условия.

Екстензивното култивиране представлява важен начален етап в лабораторната работа с микроводорасли, тъй като позволява постепенно увеличаване на количеството биомаса и получаване на физиологично активна култура, която може да бъде използвана като инокулум за последващи експерименти по оптимизация на култивационните условия и мащабиране на процеса.

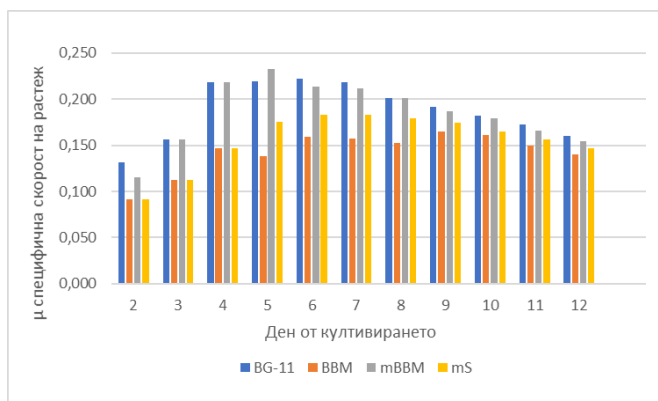
2.2. Подбор на оптимална хранителна среда за *Chlorella vulgaris* RJ1

Култивирането на *C. vulgaris* RJ1 на хранителни среди BG-11, BBM, mBBM и mSM показва най-висок ефект, изразен в натрупване на абсолютно сухо вещество при средите BG-11 и mBBM (Фиг.3). След 288h култивиране културата навлиза в ранна стационарна фаза като АСВ от 0.5g/l при 0h достига до 3.4 g/l и 3.2 g/l респективно при среди BG-11 и mBBM.



Фиг.3. Култивиране на *Chlorella vulgaris* RJ1 в различни хранителни среди.

Изчислена е и специфичната скорост на растеж във всеки ден от култивирането (Фиг. 4) като резултатите показват най-интензивен растеж на 4-ти, 5-ти и 6-ти ден от култивирането при средите BG-11 и mBBM, докато при средите BBM и mSM тя е значително по-ниска и е най-интензивна съответно на 9-ти и 6-ти ден.

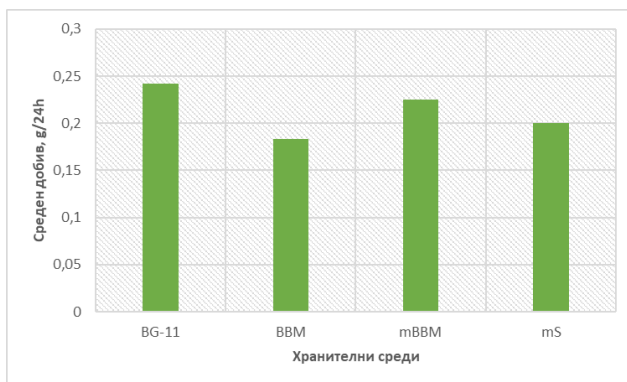


Фиг.4. Специфична скорост на растеж на *Chlorella vulgaris* RJ1 във всеки ден от култивирането на хранителни среди BG-11, BBM, mBBM, mSM.

Получените резултати показват ясно изразено влияние на състава на хранителната среда върху динамиката на растеж и натрупването на биомаса. По-високата продуктивност при средите BG-11 и mBBM вероятно се дължи на по-балансираното съдържание на азотни и фосфорни източници, както и на наличието на комплекс от микроелементи, които подпомагат фотосинтетичния метаболизъм и клетъчното делене при зелените микроводорасли.

Наблюдаваният максимум на специфичната скорост на растеж между 4-ти и 6-ти ден съответства на експоненциалната фаза на развитие на културата, при която клетъчната делителна активност е най-интензивна.

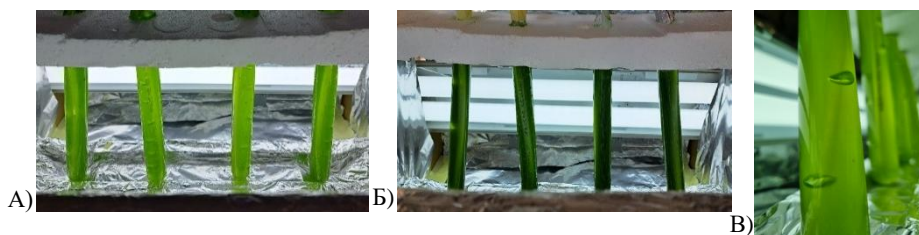
Въз основа на получените резултати, изчисления среден добив (Фиг.5) и по-ниската себестойност на хранителна среда BG-11, тя е подбрана като по-оптимална среда за култивиране с цел последващи анализи и евентуално мащабиране.



Фиг.5. Среден добив при култивирането на *Chlorella vulgaris* RJ1 на четирите хранителни среди.

2.3. Постепенно мащабиране на култивирането

Последващото намножаване на *C. vulgaris* RJ1 на среда BG-11 е извършено на прототип PPBR2 (Фиг. 6), където са постигнати и най-добрите резултати. За период от 120 часа, при стартово АСВ от 2.2 g/l, културата достигна АСВ от 8.7 g/l (най-високото АСВ постигнато по-време на дисертационната работа). Поради високата скорост на култивиране и относително малкия обем на съдовете се наложи често отливане и доливане на хранителна среда. Тези оперативни намеси увеличават риска от контаминация и показват ограниченията на използваната система при по-продължително култивиране. Въпреки това прототипът PPBR2 демонстрира висок потенциал за бързо натрупване на биомаса и послужи като основа за разработването на следващ прототип на системата (PPBR3) и за последваща оптимизация на култивационния процес.



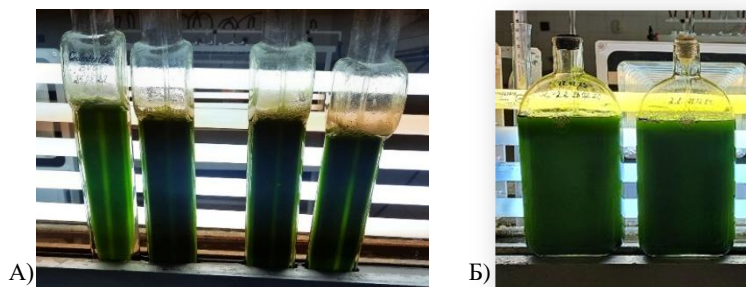
Фиг.6. Втори прототип на фотобиореактор - PPBR2. Култивиране на *Chlorella vulgaris* RJ1 – А) 0h – 2.2g/l АСВ; Б) 120h – 8.7g/l АСВ; В) Аериране в PPBR2.

Получената биомаса от система PPBR2 е използвана за посяване на микробиологични банки с отвори за аериране, които са поставени на мястото на съдовете от PPBR2 като по този начин системата се модифицира до PPBR3 (Фиг.7).



Фиг.7. Прототип на фотобиореактор - PPBR3, използван за размножаване на *Chlorella vulgaris* RJ1.

Получената микроводораслова култура с АСВ от 4,2 g/l е използвана за култивиране в по-мощните култивационни съоръжения на лаборатория „Експериментална и приложна алгология“ (ЛЕПА) описани от Дилов (1985) (Фиг.8) и на биореактор с механично разбъркване Applikon (Фиг.9).



Фиг.8. Култивиране на *Chlorella vulgaris* RJ1 в съоръженията на ЛЕПА – А) – съдове от 300ml, Б) – съдове от 1l.



Фиг.9. Култивиране на *Chlorella vulgaris* RJ1 в биореактор Applikon – работен обем 2.5 l.

Получените резултати показват, че макар прототипните системи да позволяват бързо натрупване на биомаса, те имат ограничения, свързани с поддържането на стерилност и контрола на култивационните параметри. Честите манипулации на културата, свързани с отливане и доливане на среда, увеличават риска от контаминация.

Поради тези причини последващите култивации са проведени в биореактор с механично разбъркване Applikon снабден със светлинен панел, който позволява работа при напълно стерилни условия и осигурява прецизен контрол върху основните параметри на култивиране. Системата се стерилизира заедно с хранителната среда, като инокуирането на културата и вземането на проби става стерилно. Освен това подаването на CO₂, светлинният режим и температурата са контролирани автоматично, което позволява поддържането на оптимални условия за растеж на микроводораслите и по-висока възпроизводителност на култивационния процес.

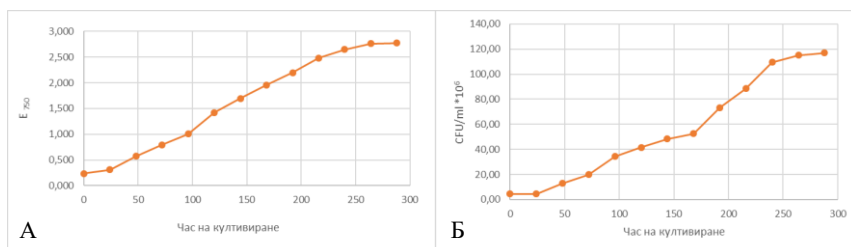
2.4. Растежна динамика на микроводораслите

Растежната динамика на *C. vulgaris* RJ1 и *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 е проследена чрез определяне на концентрацията на абсолютно сухо вещество (АСВ), оптичната плътност на културата (екстинкция), броя на живите клетки и специфичната скорост на растеж (μ).

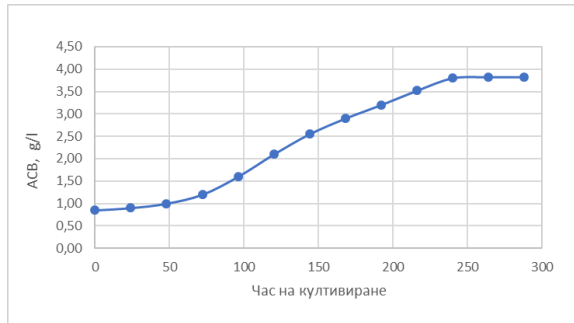
Растежна динамика на *Chlorella vulgaris* RJ1

В началния момент на култивиране на *C. vulgaris* RJ1, културата се характеризира с относително ниски стойности на биомаса и клетъчна плътност. През първите 24–72 часа се наблюдава постепенна адаптация на културата към условията на култивиране, което се проявява чрез сравнително бавно нарастване на АСВ, плътността и броя на живите клетки. Този период съответства на лаг-фазата на растеж, характерна за микроводорасловите култури след прехвърляне в нова хранителна среда.

След този период културата навлиза в експоненциална фаза, при която се наблюдава интензивно увеличаване на всички измерени показатели. Увеличението на екстинкцията на културата (Фиг.10-А) корелира добре с нарастването на концентрацията на биомаса (Фиг.11) и броя на живите клетки (Фиг.10-Б), което потвърждава, че оптичната плътност може да бъде използвана като бърз индикатор за растежа на микроводорасловата култура. В края на култивационния процес (12 дни) АСВ на клетките е 3.82 g/l.

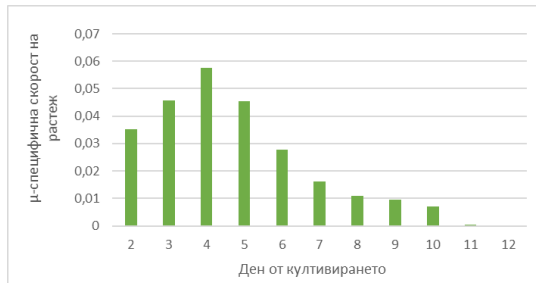


Фиг.10. Изменение на екстинкцията (А) и на концентрацията на живи клетки (Б) на култура *Chlorella vulgaris* RJ1 в условия на интензивно култивиране.



Фиг.11. Изменение на абсолютно сухото вещество в култура *Chlorella vulgaris* RJ1 в условия на интензивно култивиране.

В същия интервал се наблюдават и най-високите стойности на специфичната скорост на растеж (Фиг.12), което съответства на периода на най-интензивно клетъчно делене.



Фиг.12. Специфична скорост на растеж на култура *Chlorella vulgaris* RJ1 в различните етапи на интензивно култивиране.

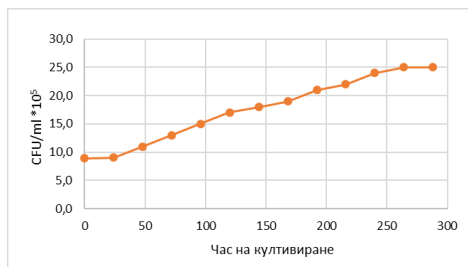
След 216–240 часа културата постепенно преминава в стационарна фаза, при която увеличението на биомасата, плътността и броя на живите клетки се забавя значително. Това вероятно се дължи на постепенното изчерпване на хранителните вещества в средата и натрупването на метаболитни продукти, които ограничават по-нататъшния растеж.

Растежна динамика на *Porphyridium aeruginеum* HINDAK 1983/2

В началния етап на култивиране се наблюдава постепенно увеличаване на всички измерени показатели, което показва адаптация на културата към условията на средата. В сравнение с *C. vulgaris* RJ1, увеличението на плътността (Фиг.13) и броя на клетките (Фиг.14) при *P. aeruginеum* се характеризират с по-постепенна динамика.



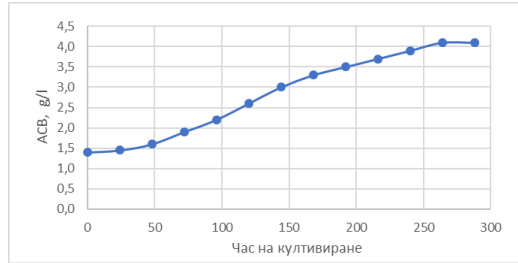
Фиг.13. Изменение на екстинкцията на култура *Porphyridium aeruginеum* HINDAK 1983/2 в условия на интензивно култивиране.



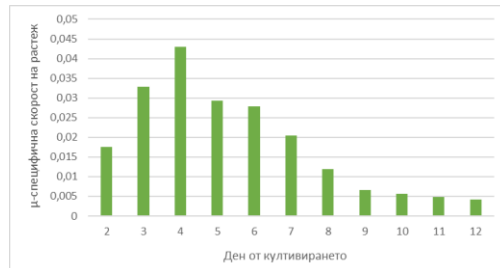
Фиг.14. Изменение на концентрацията на живи клетки в култура *Porphyridium aeruginеum* HINDAK 1983/2 в условия на интензивно култивиране.

В интервала 96–192 часа културата навлиза в експоненциална фаза, при която се наблюдава интензивно увеличаване на концентрацията на биомаса (Фиг.15), плътността и броя на клетките. В този период се регистрират и най-високите стойности на специфичната скорост на растеж (Фиг.16), което показва активна клетъчна пролиферация.

След около 240–264 часа културата достига стационарна фаза, при която увеличението на биомасата и клетъчната плътност се стабилизира. Културата достига до максимална стойност на АСВ – 4,1 g/l (Фиг.15).



Фиг. 15. Изменение на абсолютно сухото вещество в култура *Porphyridium aeruginеum* HINDAK 1983/2 в условия на интензивно култивиране.



Фиг.16. Специфична скорост на растеж на култура *Porphyridium aeruginеum* HINDAK 1983/2 в различните етапи на интензивно култивиране.

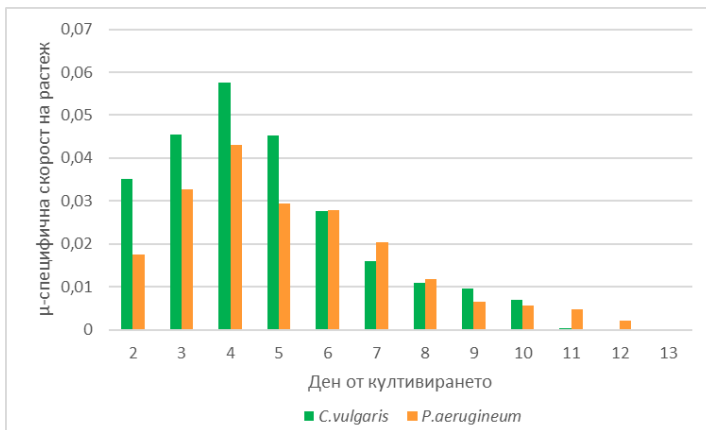
Сравнителен анализ на растежната динамика

Сравнителният анализ на растежната динамика на *C. vulgaris* RJ1 и *P. aeruginеum* HINDAK 1983/2 показва сходни общи тенденции в развитието на културите. И при двата вида се наблюдава ясно разграничение между лаг-фаза, експоненциална фаза и

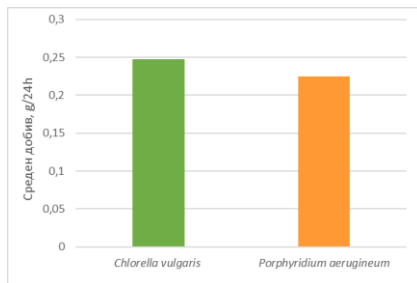
стационарна фаза, което е типично за микроводорасловите култури при лабораторно култивиране.

Въпреки това между шамовете на двата вида се наблюдават определени различия в кинетиката на растеж. *C. vulgaris* RJ1 демонстрира по-интензивно увеличение на екстинкцията и броя на живите клетки в експоненциалната фаза, което показва по-висока скорост на клетъчно делене. От друга страна, при *P. aeruginoseum* HINDAK 1983/2 увеличението на биомасата е по-постепенно, като растежът е по-равномерен през целия период на култивиране (Фиг.17).

Средният добив при двете култури също се различава (Фиг.18), което вероятно се дължи на физиологичните им особености. Видът *C. vulgaris* е известен с бързия си растеж и висока скорост на клетъчно делене при оптимални условия, докато при *P. aeruginoseum* значителна част от клетъчния метаболизъм е насочена към синтез на екзополisahариди, което може да повлияе върху скоростта на натрупване на биомаса и клетъчната динамика.



Фиг.17. Съпоставка на специфичните скорости на растеж на културите на *Chlorella vulgaris* RJ1 и *Porphyridium aeruginoseum* HINDAK 1983/2 в различните етапи на интензивно култивиране.



Фиг.18. Съпоставка на средния добив на биомаса при култивиране на *Chlorella vulgaris* RJ1 и *Porphyridium aeruginum* HINDAK 1983/2.

Получените резултати показват, че при използваните култивационни условия двата вида достигат сходни крайни стойности на абсолютно сухо вещество, но се различават по динамиката на растежа и интензивността на клетъчното делене.

3. Морфологична характеристика на използваните шамове

Морфологичната характеристика на микроводораслите е важен етап при тяхното изследване, тъй като клетъчната структура, размерът и особеностите на клетъчната стена са тясно свързани с физиологичните свойства, метаболитния потенциал и приложимостта им в биотехнологиите.

Морфологичната характеристика на използваните микроводорасли беше извършена чрез микроскопско наблюдение на културите в края на експоненциалната фаза на растеж при 1000x увеличение. Анализът имаше за цел да потвърди типичните морфологични особености на двата изследвани вида и да оцени състоянието на клетките при култивиране.

3.1. Морфология на *Chlorella vulgaris* RJ1

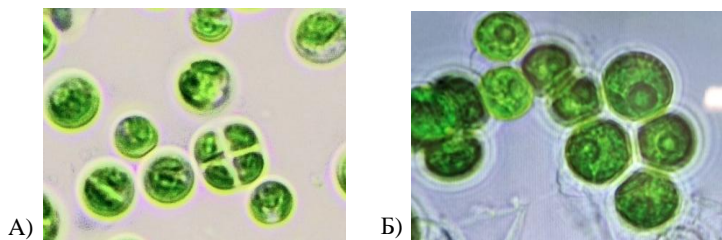
При изследване със светлинен микроскоп клетките на *C. vulgaris* RJ1 са наблюдавани като единични сферични клетки с гладка клетъчна повърхност (Фиг. 19 - А), равномерно разпределени в културата и не образуваха стабилни агрегати или колонии. Размерът на клетките варираше в диапазона 8–12 μm , което ги поставя в горната граница на

размерите, описани за този вид. В клетките се наблюдаваше характерно интензивно зелено оцветяване, дължащо се на наличието на фотосинтетични пигменти. Наблюдаваха се и клетки в различни стадии на делене, което е характерно за размножаването чрез автоспори при този вид.

3.2. Морфология на *Porphyridium aerugineum* HINDAK 1983/2

Клетките на *P. aerugineum* HINDAK 1983/2 се наблюдаваха като сферични структури със значително по-голям размер в сравнение с клетките на *C. vulgaris* RJ1 (Фиг. 19). Размерът на клетките варираше между 12 и 18 μm , което ги прави приблизително 1.5–2 пъти по-големи от клетките на *Chlorella*. Клетките бяха в тъмно зелен цвят, вероятно свързан със съотношението между различните фотосинтетични пигменти в тях.

Характерна особеност беше наличието на мукозна обвивка около клетките, която образуваше ясно различима халообразна зона около тях. В културата се наблюдаваше и тенденция към образуване на малки клетъчни агрегати, което вероятно е свързано с наличието на полизахаридна матрица около клетките.



Фиг. 19. Светлинна микроскопия на клетки на *Chlorella vulgaris* RJ1 (А) и *P. aerugineum* HINDAK 1983/2 (Б) (1000x).

3.3. Сравнителен морфологичен анализ

Сравнителният анализ между двата вида микроводорасли показва съществени различия в клетъчната морфология и организация. *C. vulgaris* RJ1 се характеризира с компактни сферични клетки и относително хомогенна клетъчна популация, докато *P. aerugineum* HINDAK 1983/2 демонстрира по-голям клетъчен размер и наличие на изразена полизахаридна обвивка.

Щамовете на двата вида микроводорасли се различават и по пигментен състав, който отразява принадлежността им към различни таксономични групи и определя специфичните им фотосинтетични свойства.

Клетъчна стена

След наблюдение на клетъчната стена е установено и друго съществено различие между *C. vulgaris* RJ1 и *P. aeruginum* HINDAK 1983/2 в структурата на клетъчната им обвивка, която отразява техните физиологични особености и биотехнологичен потенциал. При *C. vulgaris* RJ1 е налице добре организирана, твърда и многослойна клетъчна стена, докато при *P. aeruginum* HINDAK 1983/2 не се наблюдава класическа компактна клетъчна стена.

4. Биохимичен профил на получените култури на *Chlorella vulgaris* RJ1 и *Porphyridium aeruginum* HINDAK 1983/2

Биохимичният състав на микроводорасловата биомаса е един от основните показатели за метаболитния потенциал на културите и тяхната приложимост в биотехнологични и агрономически системи. Биохимичното охарактеризиране на изследваните микроводорасли включва както анализ на основните компоненти на клетъчната биомаса, така и определяне на някои извънклетъчни метаболити, секретирани в културалната среда.

4.1. Въглехидрати

Анализът на общото съдържание на въглехидрати в клетъчната биомаса показва различия между двата изследвани вида микроводорасли. При *C. vulgaris* RJ1 е установено съдържание на въглехидрати 25.1%, докато при *P. aeruginum* HINDAK 1983/2 стойността достига 39,1%. Тези резултати показват, че при използваните условия на култивиране *P. aeruginum* HINDAK 1983/2 натрупва по-голямо количество въглехидрати в биомасата си в сравнение с *C. vulgaris* RJ1. Тъй като анализът е извършен върху отделената след центрофугиране биомаса, получените стойности отразяват вътреклетъчната и клетъчно-асоциираната въглехидратна фракция, а не извънклетъчните полизахариди.

Съпоставката между двата вида показва различен модел на разпределение на фиксирания въглерод в клетъчния метаболизъм. При *C. vulgaris* RJ1 въглехидратите са представени в умерен дял, което е съвместимо с добре известния белтъчно ориентиран профил

на този вид. При *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2, напротив, въгледехидратната фракция е по-силно изразена, което предполага по-активно насочване на асимилирания въглерод към синтез на захарни и полизахаридни структури.

4.2. Белтъци

Анализът на белтъчното съдържание в биомасата на двата изследвани вида показва съществени различия. При *C. vulgaris* RJ1 е установено съдържание на белтъци 52.9%, докато при *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 белтъчната фракция е 30.7%. Данните показват, че при използваните условия на култивиране *C. vulgaris* RJ1 формира биомаса с ясно изразен белтъчен характер.

Съпоставката между щамовете от двата вида показва, че *C. vulgaris* RJ1 има по-голям потенциал като източник на белтъчно богата биомаса, докато при *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 белтъчната фракция е по-умерено представена.

4.3. Пигменти

Съгласно използваната методика, при *C. vulgaris* RJ1 са проследени хлорофил *a*, хлорофил *b* и каротеноиди, а при *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 – хлорофил *a*, каротеноиди и фикобилипротеини. Пигментният анализ показва ясно изразени различия между двата изследвани щамове. При RJ1 са установени хлорофил *a* – 0.88%, хлорофил *b* – 0.34% и каротеноиди – 0.17%. При HINDAK 1983/2 са отчетени хлорофил *a* – 0.92%, каротеноиди – 0.48% и общо фикобилипротеини – 9,04%.

При *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 освен хлорофил *a* и каротеноиди се установява и високо съдържание на фикобилипротеини, което е характерна особеност на червените микроводорасли. Специфичното за щамове е, че общата стойност на фикобилипротеините от 9,04% се разпределя както следва: фикоцианин – 5.12%, алофикоцианин – 3.32% и фикоеритрин – 0.60% от сухото вещество.

Интересно е, че този профил е в съответствие и с наблюдавания тъмно-зелен цвят на културата, който предполага доминиране на фикоцианина. Това отличава изследвания сладководен щам от типично яркочервените морски представители на рода *Porphyridium*, при които фикоеритринът е преобладаващ пигмент.

Резултатите показват, че *C. vulgaris* RJ1 се характеризира с класически хлорофилно-каротеноиден профил, докато *P. aeruginum* HINDAK 1983/2 има по-сложна и биотехнологично по-ценна пигментна система, включваща значително количество фикобилипротеини. Това е важно, тъй като именно тези пигменти се свързват с висока антиоксидантна активност и с потенциално приложение в биотехнологични и агробιοлогични продукти.

4.4. Липиди

Анализът на липидното съдържание показва, че при *C. vulgaris* RJ1 общите липиди съставляват 13.5% от сухото вещество, докато при *P. aeruginum* HINDAK 1983/2 те са 10.38%. Данните показват умерено съдържание на липиди и при двата вида, като щамът на *C. vulgaris* натрупва малко по-висок липиден дял от щама на *P. aeruginum*.

Сравняването и анализът на получените резултати за липидното съдържание показват, че изследваните щамове на двата вида микроводорасли могат да бъдат разглеждани като източник на липидни съединения, но без изразено липидно натрупване. В този аспект *C. vulgaris* RJ1 се отличава с малко по-високо общо съдържание на липиди, докато при *P. aeruginum* HINDAK 1983/2 по-голям интерес би представлявал качественият състав на липидната фракция. Получените резултати допълват общата биохимична характеристика на двата вида (Таблица 1) и потвърждават, че липидите са важен, но не водещ компонент в състава на изследваната биомаса.

Таблица 1. Общо представяне на биохимичния състав на *Chlorella vulgaris* RJ1 и *Porphyridium aeruginum* HINDAK 1983/2.

Биохимичен показател	<i>Chlorella vulgaris</i> RJ1	<i>Porphyridium aeruginum</i> HINDAK 1983/2
Въглехидрати	25.10 ± 2.7 %	39.10 ± 4.1 %
Белтъци	52.90 ± 4.2 %	30.70 ± 3.5 %
Липиди	13.50 ± 2.5 %	10.38 ± 1.9 %
Хлорофил <i>a</i>	0.88 ± 0.04 %	0.92 ± 0.06 %
Хлорофил <i>b</i>	0.34 ± 0.04 %	0.00 %
Каротеноиди	0.17 ± 0.03 %	0.48 ± 0.1 %
Фикобилипротеини	0.00 %	9.04 ± 1.2 %

4.5. Екзополисахариди

Количественият анализ на екзополисахаридите в културалната среда показва съществени различия между двата изследвани вида. При *C. vulgaris* RJ1 е отчетено съдържание на екзополисахариди 45 mg/g, докато при *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 стойността достига 467 mg/g. Тъй като анализът се извършва върху супернатанта след отделяне на клетъчната биомаса, получените резултати отразяват количеството на секретирани извънклетъчни полизахариди, а не въглехидратния дял в самата биомаса.

За разлика от *C. vulgaris* RJ1, при *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 е установена многократно по-висока екзополисахаридна продукция. Това е в пълно съответствие с особеностите на рода *Porphyridium*, който е добре известен като продуцент на сулфатирани извънклетъчни полизахариди с висока стабилност, вискозитет и разнообразни биологични ефекти. Именно ЕПЗ се разглеждат като една от най-ценните биотехнологични характеристики на червените микроводорасли от този род (Фиг.20).

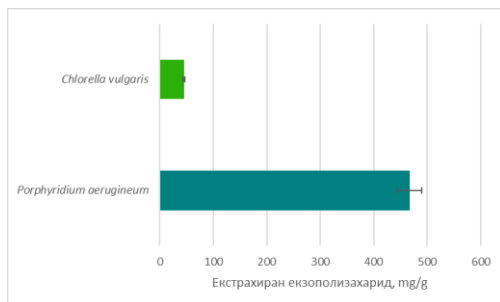


Фиг.20. Лиофилизиран екзополисахарид, екстрахиран от супернатанта на клетъчната култура от *Porphyridium aeruginosa* HINDAK 1983/2

Съпоставката между двата вида показва, че *C. vulgaris* RJ1 и *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 се различават отчетливо по отношение на екзометаболитния си профил. Докато при щама на първия вид екзополисахаридите са слабо представени, то при щама на втория вид те са основен секретирани продукт, което повишава приложната стойност на вида.

В обобщение, *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 се отличава с многократно по-висока продукция на екзополисахариди в сравнение с *C. vulgaris* RJ1 (Фиг.21), което

потвърждава характерната за рода *Porphyridium* способност за интензивна секреция на извънклетъчни полизахариди и подчертава потенциала на вида като източник на биоактивни EPS.



Фиг.21. Визуално представяне на количественото съотношение на екстрахираните полизахариди при *C. vulgaris* RJ1 и *P. aeruginum* HINDAK 1983/2.

4.6. Антиоксидантна активност

Антиоксидантна активност на клетъчните екстракти

Антиоксидантната активност на изходните култури на *C. vulgaris* RJ1 и *P. aeruginum* HINDAK 1983/2 е оценена чрез определяне на общо съдържание на полифеноли, общо съдържание на флавоноиди, както и чрез FRAP и ABTS тестове. Получените резултати показват ясно изразени различия между двата вида.

При *C. vulgaris* RJ1 е установено по-високо съдържание както на общи полифеноли – 16.37 mg GAE g⁻¹ DW, така и на общи флавоноиди – 11.13 mg QE g⁻¹ DW, в сравнение с *P. aeruginum* HINDAK 1983/2 при който стойностите са съответно 6.36 mg GAE g⁻¹ DW и 3.016 mg QE g⁻¹ DW. Сходна тенденция се наблюдава и при определяне на антиоксидантния капацитет, като при RJ1 са отчетени 61.68 μmol TE g⁻¹ DW по метода FRAP и 32.03 μmol TE g⁻¹ DW по метода ABTS, докато при HINDAK 1983/2 стойностите са съответно 20.32 μmol TE g⁻¹ DW и 10.01 μmol TE g⁻¹ DW. Процентът на инхибиране в ABTS теста също е по-висок при *C. vulgaris* RJ1 (56%) в сравнение с *P. aeruginum* HINDAK 1983/2 (25.57%).

Съпоставката между двата щама показва, че *C. vulgaris* RJ1 се характеризира с по-високо съдържание на фенолни и флавоноидни съединения и с по-силно изразена редуцираща и радикал-неутрализираща активност. Това вероятно се дължи на по-голямото участие на етанол-разтворими антиоксиданти в клетъчната биомаса на този вид. При *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 по-ниските стойности не изключват наличие на антиоксидантен потенциал, а по-скоро предполагат, че той е свързан с други групи биоактивни вещества, като пигменти и екзополisahариди.

Антиоксидантна активност на получените екзополisahариди

Антиоксидантната активност на изолираните екзополisahариди от *C. vulgaris* RJ1 и *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 е оценена чрез ABTS тест, като резултатите са изразени като $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ и като процент на инхибиране. Получените резултати показват ясно изразени различия между шамовете на двата вида. Екзополisahаридната фракция от *C. vulgaris* RJ1 показва антиоксидантна активност $103 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ и 9% инхибиране, докато при *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 са установени значително по-високи стойности — $675 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ и 44,29% инхибиране.

Резултатите показват, че екзополisahаридите на *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 притежават значително по-силна способност за неутрализиране на ABTS радикала в сравнение с екзополisahаридите на *C. vulgaris* RJ1.

По-ниската активност на екзополisahаридите при *C. vulgaris* RJ1 не изключва наличие на антиоксидантен потенциал, но показва, че в случая тази фракция е по-слабо активна спрямо ABTS радикала.

Сравнението между шамовете на двата вида показва, че антиоксидантната активност на екзополisahаридите не следва тенденцията, наблюдавана при клетъчните екстракти (Таблица 2). Докато при клетъчните екстракти *C. vulgaris* RJ1 показва по-високи стойности по отношение на полифеноли, флавоноиди, FRAP и ABTS, при екзополisahаридната фракция ясно доминира *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 (Таблица 2). Това подчертава различната биохимична организация на двата вида и показва, че при HINDAK 1983/2 значима част от антиоксидантния потенциал вероятно е изнесена в секретираниите извънклетъчни полисахариди.

Таблица 2. Сравнение между антиоксидантната активност на биомасата и екзополисахаридите на *Chlorella vulgaris* RJ1 и *Porphyridium aeruginеum* HINDAK 1983/2.

Показател	<i>P. aeruginеum</i>	<i>C. vulgaris</i>
Биомаса		
Полифеноли (mg GAE g ⁻¹ DW)	6.36 ± 0.95	16.37 ± 2.47
Флавоноиди (mg QE g ⁻¹ DW)	3.016 ± 0.75	11.13 ± 2.78
FRAP (μmol TE g ⁻¹ DW)	20.32 ± 3.05	61.68 ± 9.25
ABTS (μmol TE g ⁻¹ DW)	10.01 ± 2.01	32.03 ± 6.41
ABTS (% инхибиране)	25.57 ± 5.11 %	56 ± 11.2 %
Екзополисахариди (EPS)		
ABTS (μmol TE g ⁻¹ EPS)	675 ± 168.75	103 ± 25.75
ABTS (% инхибиране)	44.29 ± 11.07 %	9 ± 2.25 %

От гледна точка на приложението в земеделието тези резултати са особено важни. Екзополисахаридите с по-висока антиоксидантна активност могат да бъдат разглеждани като перспективни компоненти на биостимуланти с възможно защитно действие спрямо оксидативен стрес в растенията, както и с потенциална роля в подобряване на устойчивостта към неблагоприятни условия.

4.7. Екзоензими

Чрез APIZYM тест е установено наличие на няколко хидролитични ензима и при двата изследвани вида. При *C. vulgaris* RJ1 е отчетено наличие на естераза, естераза-липаза, левцин ариламидаза и нафтол-AS-BI-фосфохидролаза, докато при *P. aeruginеum* HINDAK 1983/2 са установени естераза, естераза-липаза и нафтол-AS-BI-фосфохидролаза. Това показва, че и двата щама притежават ензимен потенциал за разграждане на органични субстрати, а при *C. vulgaris* RJ1 ензимният профил е по-разнообразен поради наличието и на левцин ариламидаза.

Естеразата и естераза-липазата участват в хидролизата на естерни връзки в ниско- и средноверижни липидни субстрати. От агробιοтехнологична гледна точка това е важно,

тъй като подобни ензими могат да подпомагат разграждането на органични остатъци и трансформацията на липидни компоненти в ризосферата, с което да допринасят за минерализацията на органично вещество и за освобождаването на по-достъпни за растенията съединения.

Установената левцин ариламидазна активност при *C. vulgaris* RJ1 показва способност за хидролиза на пептидни връзки и разграждане на белтъчни субстрати до по-малки пептиди и аминокиселини. Това има потенциално значение за растенията, тъй като подобни ензимни активности могат да участват в превръщането на органично свързан азот в по-лесно усвоими форми.

Особен интерес представлява установената и при двата вида нафтол-AS-BI-фосфо-хидролазна активност. Този ензим участва в минерализацията на органичен фосфор и съответно повишава неговата достъпност в почвата.

Съпоставката между щамове на двата вида показва, че *C. vulgaris* RJ1 има по-широк ензимен профил, включващ както липолитични, така и протеолитично насочени активности, докато *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 се характеризира с по-ограничен, но също функционално значим набор от екзоензими. От гледна точка на земеделието това означава, че и двата щамове биха могли да участват в подобряване на средата около корена чрез разграждане на органични съединения и подпомагане на кръговрата на хранителните елементи.

4.8. Фитохормони

LC-MS/MS профилирането на фитохормоните в супернатанта от културите *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 и *C. vulgaris* RJ1 показва различия в техния профил (Таблица 3).

Сред съединенията, свързани с гиберелиновия метаболизъм, гиберелин A₈ (GA₈) и метаболита GR5 са в най-високи концентрации. *C. vulgaris* RJ1 съдържа значително по-високи нива на GA₈ (61.92 ng/ml) в сравнение с *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 (20.66 ng/ml), докато последният натрупва значително по-високи количества GR5 (12.83 ng/ml в сравнение с 1.37 ng/ml в *C. vulgaris* RJ1). Биоактивни гиберелини като GA₁, GA₃, GA₄ и GA₅ са открити само при ниски концентрации и в двете култури. Въпреки че GA₈ е

неактивен катаболитен продукт, генериран по време на метаболитната инактивация на биоактивни гиберелини като GA₁, неговото присъствие показва активен гиберелинов метаболизъм в културите.

Цитокинина транс-зеатин присъства в сходни умерени нива и при двата щама (*P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 - 2.96 ng/ml; *C. vulgaris* RJ1 - 3.06 ng/ml).

IAA е по-висока в *C. vulgaris* RJ1 (0.67 ng/ml), отколкото в *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 (0.45 ng/ml). Установените ауксини дори и в минимални количества насърчават образуването на корени, удължаването и разклоняването им, както и ефективността на усвояване на хранителни вещества.

Съдържанието на жасмонова киселина (JA) е значително по-високо в *C. vulgaris* RJ1 (12.07 ng/ml) от това в *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 (7.45 ng/ml). Откриването на жасмонова киселина (JA) предполага двойна роля на екзометаболитите на микроводораслите в насърчаването на растежа, като същевременно се стимулират пътищата за реакция при стрес. За разлика от това, абсцисиновата киселина (ABA) е по-висока в *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 (2.91 ng/ml), отколкото в *C. vulgaris* RJ1 (1.48 ng/ml).

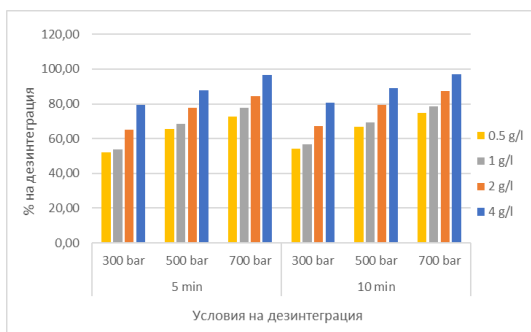
Таблица. 3. Концентрация на фитохормоните в супернатанта на култури *Porphyridium aeruginosa* HINDAK 1983/2 и *Chlorella vulgaris* RJ1.

Хормонална група	Съединение	<i>P. aeruginosa</i> HINDAK 1983/2	<i>C. vulgaris</i> RJ1
Ауксини	Индол-3-оцетна киселина (IAA)	0.45	0.67
	Индол-3-маслена киселина (IBA)	0.10	0.09
	Индол-3-пропионова киселина (IPA)	0.11	0.14
Цитокинини	Транс-зеатин	2.96	3.06
Гиберелини и сродни съединения	Гиберелин A ₁ (GA ₁)	0.19	0.61
	Гиберелин A ₃ (GA ₃)	0.41	0.11
	Гиберелин A ₄ (GA ₄)	0.04	0.11
	Гиберелин A ₅ (GA ₅)	0.21	0.01
	Гиберелин A ₈ (GA ₈)	20.66	61.92
	GR5 (свързан с гиберелините метаболит)	12.83	1.37
Други фитохормони	Жасмонова киселина (JA)	7.45	12.07
	Абсцисинова киселина (ABA)	2.91	1.48

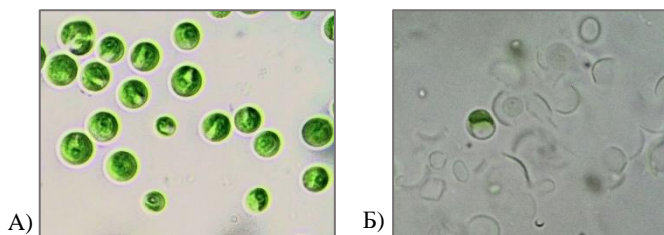
5. Дезинтеграция на получените микроводораслови култури

За освобождаване на вътречлетъчните компоненти от биомасата на двата изследвани щама е приложена дезинтеграция под налягане при 300, 500 и 700 bar, с продължителност 5 и 10 min, при концентрация на абсолютно сухо вещество (АСВ) 0.5, 1.0, 2.0 и 4.0 g/l. Получените резултати показват ясно изразена зависимост на степента на дезинтеграция както от приложеното налягане, така и от концентрацията на биомасата, докато ефектът на времето е по-слабо изразен.

При *C. vulgaris* RJ1 процентът на дезинтеграция варира в широк интервал – от 52.30% при 0.5 g/l, 5 min и 300 bar до 97.08% при 4.0 g/l, 10 min и 700 bar (Фиг. 27). Още при най-ниската изследвана концентрация се наблюдава плавно повишаване на ефекта с увеличаване на налягането – от 52.30% при 300 bar до 65.33% при 500 bar и 72.66% при 700 bar за 5 min, а при 10 min стойностите достигат съответно 54.37%, 66.82% и 74.82%. С увеличаване на концентрацията на биомасата тази тенденция се запазва и става още по-отчетлива: при 2.0 g/l дезинтеграцията достига 84.61% за 5 min и 87.26% за 10 min при 700 bar, докато при 4.0 g/l тя практически се доближава до пълно разрушаване на клетъчната структура – 96.52% и 97.08% съответно за 5 и 10 min при 700 bar (Фиг. 22 и 23). Тази висока чувствителност на щам RJ1 към механично въздействие при по-високи налягания може да се обясни с факта, че макар видът да е известен с относително устойчива клетъчна стена, тя все пак подлежи на ефективно разрушаване при достатъчно интензивно механично напрежение.

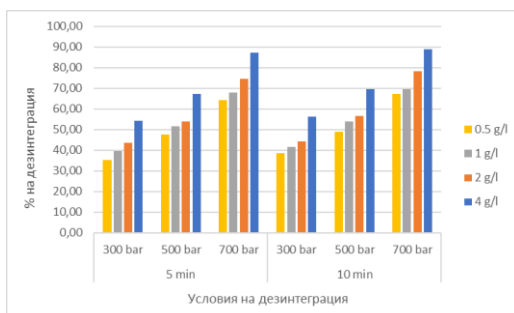


Фиг.22. Дезинтеграция на клетъчна култура на *Chlorella vulgaris* RJ1 при различни условия на хомогенизационния процес.



Фиг.23. *Chlorella vulgaris* RJ1 с АСВ 2g/l преди(А) и след(Б) дезинтеграция при 700bar за 5 min.

При *P. aeruginosum* HINDAK 1983/2 също се установява отчетлива положителна зависимост между налягането и процента на дезинтеграция, но абсолютните стойности са по-ниски в сравнение с *C. vulgaris* RJ1 при съпоставими условия. Общият диапазон е от 35.11% при 0.5 g/l, 5 min и 300 bar до 89.04% при 4.0 g/l, 10 min и 700 bar (Фиг. 24). При 0.5 g/l и 5 min ефектът нараства от 35.11% при 300 bar на 47.56% при 500 bar и 64.44% при 700 bar; при 4.0 g/l съответните стойности са значително по-високи – 54.15%, 67.19% и 87.26% за 5 min, а при 10 min достигат 56.15%, 69.48% и 89.04% (Фиг. 24). По-ниската чувствителност на *P. aeruginosum* HINDAK 1983/2 при 300 и 500 bar в сравнение с *C. vulgaris* RJ1 вероятно се дължи не толкова на „по-здрава“ класическа клетъчна стена, а на особената организация на повърхностните структури на червените микроводорасли от рода *Porphyridium*.



Фиг.24. Дезинтеграция на клетъчна култура на *Porphyridium aeruginosum* HINDAK 1983/2 при различни условия на хомогенизационния процес.

Сравнението между двата щама показва, че във всички съпоставими варианти *C. vulgaris* RJ1 достига по-висок процент на дезинтеграция от *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2. Разликата е най-изразена при 300 и 500 bar, където средното превъзходство на RJ1 е приблизително с 19 %, докато при 700 bar разликата намалява до около 8.9 %. Това е особено интересен резултат, защото показва, че при достатъчно високо налягане различията между видовете частично се преодоляват - при по-нисък механичен интензитет видово-специфичните особености на клетъчната повърхност играят решаваща роля, докато при 700 bar разрушителният ефект става достатъчно силен, за да доведе и при двата вида до много високи степени на дезинтеграция.

Особено показателна е и зависимостта от концентрацията на биомасата. И при двата изследвани щама с увеличаване на АСВ от 0.5 до 4.0 g/l се наблюдава съществено повишаване на дезинтеграцията. При *C. vulgaris* RJ1 средната стойност нараства от 64.38% при 0.5 g/l до 88.39% при 4.0 g/l, а при *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 – от 50.37% до 70.54%. В същото време повишената концентрация увеличава и общия брой клетки, подложени на разрушаване в зоната на клапана, което при използваните условия е довело до по-висок интегрален ефект. Тази зависимост не е универсална за всички системи, но е съвместима с разбирането, че ефективността на дезинтеграцията под високо налягане е силно матрично- и видово-зависима и трябва да се оптимизира за всяка биомаса поотделно.

Като резултат от проведените експерименти беше отчитана и температурата на дезинтеграцията, която също се повишава с увеличаване на интензивността на обработката. При провеждане на дезинтеграцията температурата варираше от около 32–35°C при по-леките режими до 40–43°C при по-продължителните или по-интензивни варианти.

От практическа гледна точка резултатите показват, че 700 bar е най-ефективният от изследваните режими и за двата щама, като при *C. vulgaris* RJ1 той води почти до пълна дезинтеграция, а при *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 – до много високи стойности, особено при 4.0 g/l. Разликите между 5 и 10 min са сравнително малки, което предполага, че за последващи приложения и мащабиране на процеса условията 5 min при 700 bar могат да бъдат технологично по-изгоден компромис между ефективност и енергиен разход. Избраните параметри за дезинтеграция бяха използвани в последващите биологични

тестове, тъй като осигуряват висока степен на клетъчно разрушаване и подходящо освобождаване на ендометаболити за оценка на биостимулиращия ефект.

В обобщение, получените резултати показват, че дезинтеграцията под налягане е високоефективен подход за обработка както на *C. vulgaris* RJ1, така и на *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2, но с ясно изразена видова специфичност. Щамът RJ1 показва по-висока степен на разрушаване при всички режими, докато щамът HINDAK 1983/2 вероятно демонстрира по-голяма устойчивост на по-ниски налягания поради наличието на богата на екзополisahариди външна матрица. Въпреки това, при 700 bar щамовеите на двата вида достигат високи нива на дезинтеграция, което прави този режим особено подходящ за последващо извличане на ендометаболити. Така получените резултати са не само технологично значими, но и добре съгласувани със съвременните представи за влиянието на клетъчната архитектура и процесните параметри върху ефективността на дезинтеграцията под налягане при микроводорасли.

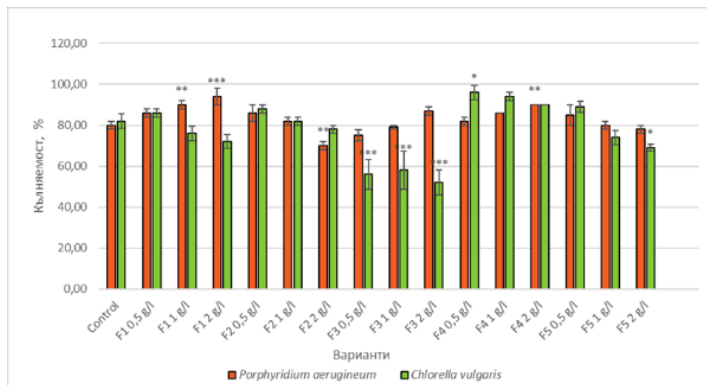
6. Анализ на ефекта на *Chlorella vulgaris* RJ1 и *Porphyridium aeruginosa* HINDAK 1983/2 върху кълняемостта и прорастването на семена *Lactuca sativa*

За да се установи биостимулиращият потенциал на екзо- и ендометаболитите на клетъчните култури на *C. vulgaris* RJ1 и *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 е проведен тест със семена на *L. sativa* – маруля. Като са отчетени промените в кълняемостта на семената, биометрията, биомасата и жизнеността на кълновете.

6.1. Кълняемост

Най-силно изразен положителен ефект с *C. vulgaris* RJ1 се наблюдава при варианта с биомаса. Биомасата в концентрация 0.5 g/l води до най-висок процент на покълване - 96% спрямо 82.0% при контролата. Вариантите с дезинтегрирана биомаса и цяла клетъчна култура на *C. vulgaris* RJ1 също повишават процента на покълване при концентрация 0.5 g/l, съответно със 7% и 5%. Същевременно супернатанта на RJ1 показва тенденция към намаляване на покълването, с увеличаване на концентрацията, като най-силно изразен инхибиращ ефект е отчетен при 2 g/l (52%) (Фиг.25).

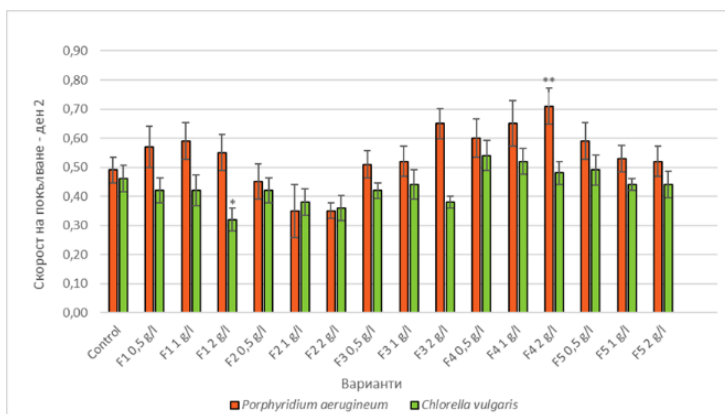
При третирането с *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 най-висока кълняемост се наблюдава при използване на цяла клетъчна култура при 2 g/l (94%), което представлява увеличение с 14% спрямо контролата (80%). Биомасата и дезинтегрираната биомаса на *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 също повишават процента на кълняемост (за биомасата при 2 g/l тя е 90%; за дезинтегрираната биомаса при 0.5g/l тя е 85%).



Фиг.25. Ефект на всички варианти върху общия процент на покълване

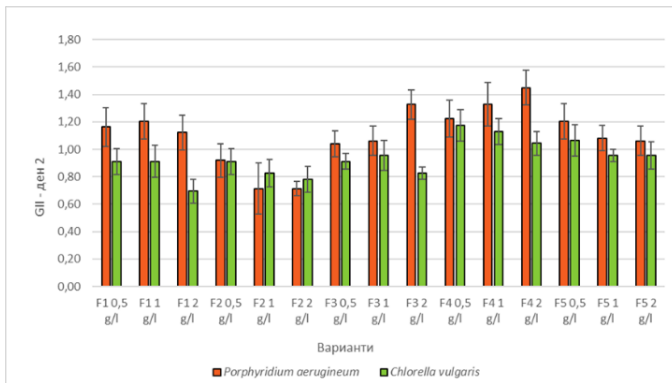
F1 – клетъчна култура, F2 – дезинтегрирана клетъчна култура, F3 – супернатант, F4 – биомаса, F5 – дезинтегрирана биомаса, изследвани при три концентрации на изходната култура – 0.5, 1 и 2 g/l сухо вещество в изходната клетъчна култура. Стойностите са представени като средна стойност ± стандартно отклонение (n = 3). Звездичките означават статистически значими различия спрямо контролата (Tukey HSD: * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001).

Скоростта на покълване също е изчислена за всеки ден от процеса на покълване (Фиг.26), като най-силният ефект се установява на втория ден, когато е отчетено и най-масовото покълване на семена - над 50% във всички варианти. Най-изявен е стимулиращият ефект при третиране с биомаса от *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 (0.65 при 1g/l и 0.71 при 2g/l в сравнение с 0.49 при контролния вариант), както и при най-висококонцентрираният супернатант (0.65 в сравнение с 0.49 при контролния вариант).



Фиг. 26. Скорост на покълване, представена за всички варианти на втория ден от покълването. Обозначенията са като на фиг. 25.

На базата на скоростта на покълване е изчислен и индексът на подобрене на покълването (GII) (Фиг. 27) за всеки ден от процеса на покълване. При вариантите на третиране с микроводорасловата култура *C. vulgaris* RJ1 стимулиране на кълняемостта, в деня на масовото покълване, се отчита при използването на чиста биомаса без екзометаболити. При другите варианти стойността на GII е или по-ниска или близка до 1. При вариантите с *P. aeruginosum* HINDAK 1983/2, обаче, стойности на GII над 1 се установяват при третиране с цяла клетъчна култура, супернатант, биомаса и ниска концентрация на дезинтегрирана биомаса, като при последната се наблюдава намаляване на ефекта с увеличаване на концентрацията. Най-високи стойности на GII при *P. aeruginosum* HINDAK 1983/2 са отчетени при биомаса в концентрации 1 g/l и 2 g/l, както и при супернатант в концентрация 2 g/l (съответно 1.33, 1.33 и 1.45).



Фиг.27. Индекс на подобрене на покълването, представен за всички варианти на втория ден от покълването. Обозначенията са като на фиг.25.

Резултатите от приложените експериментални формулировки показват промяна в процентите на покълване в зависимост от вида на формулировката и нейната концентрация, което потвърждава, че видовата принадлежност на микроводораслите и съставът на приложените формулировки играят ключова роля за реакцията на семената.

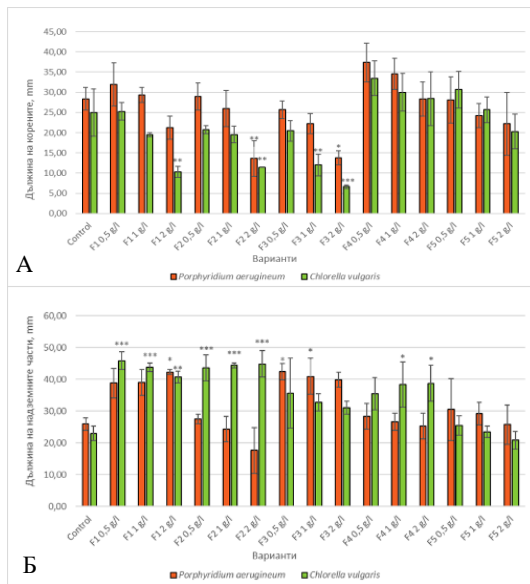
Съществената разлика между двата изследвани щама е, че при *C. vulgaris* RJ1 водещо значение за повишаване на кълняемостта има биомасата, докато при *P. aerugineum* HINDAK 1983/2 положителен ефект е наблюдаван и при наличието на екзосклетъчни метаболити. Това показва, че при щам RJ1 биостимулиращото действие е по-тясно свързано с клетъчния състав, докато при щам HINDAK 1983/2 голямо значение имат и метаболитите, отделени в културалната среда. От практическа гледна точка това означава, че *C. vulgaris* RJ1 е по-подходяща като източник на биомаса за стимулиране на покълването, докато *P. aerugineum* HINDAK 1983/2 показва потенциал както под формата на биомаса, така и под формата на супернатант или цяла клетъчна култура.

6.2. Анализ на ефекта върху биометрията на кълновете

Биометричните показатели показват зависимост както от формулировката, така и от нейната концентрация при щамовете и на двата вида микроводорасли (Фиг. 28 –29). Като цяло е наблюдавано по-силно стимулиране на растежа на надземната част в сравнение с

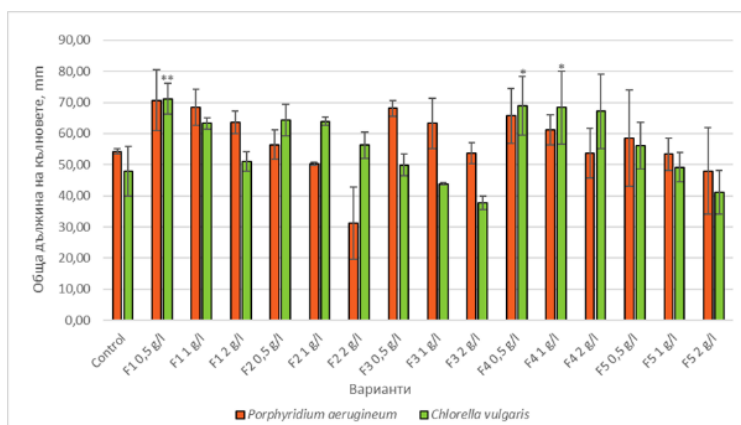
развитието на кореновата система, което показва предпочитано насочване на ресурсите към надземния растеж в ранните етапи на развитие на растенията.

Всички варианти на културата на *C. vulgaris* RJ1 с изключение на най-високата концентрация на дезинтегрирана биомаса, стимулират удължаването на летораста. Най-изразен ефект е отчетен при клетъчна култура в концентрация 0.5 g/l (увеличение с 99.83%) и при дезинтегрирана клетъчна култура в концентрация 0.5 g/l (увеличение с 120.55%), при които дължината на летораста почти се удвоява спрямо контролните растения (Фиг.28-Б). При *P. aeruginosum* HINDAK 1983/2 стимулирането на кореновия растеж е наблюдавано основно при третирането с биомаса и при ниски концентрации на цяла и дезинтегрирана клетъчна култура (Фиг.28-А), докато стимулирането на летораста е по-силно изразено при варианти, богати на екзометаболити, като супернатант и цяла клетъчна култура (Фиг.28-Б).



Фиг.28. Стимулиращ/инхибиращ ефект на *Porphyridium aeruginosum* HINDAK 1983/2 и *Chlorella vulgaris* RJ1 върху развитието на кореновата система(А) и надземните части(Б) на *Lactuca sativa*. Обозначенията са като на фиг.25.

Получените данни за дължината на корените и леторастите са използвани за изчисляване на общата дължина на кълна (Фиг.29). В експеримента с *P. aeruginum* HINDAK 1983/2 най-висок биостимулиращ потенциал е отчетен при клетъчна култура 0.5 g/l (+45.47%), супернатант 0.5 g/l (+25.42%) и биомаса 0.5 g/l (+21.04%), което показва участието както на екзогенни, така и на ендогенни метаболити на микроводораслите в развитието на кълновете на *L. sativa* (Фиг.29). От друга страна, при *C. vulgaris* RJ1 е наблюдавана не само зависимост от типа метаболити, но и ясно изразена зависимост от концентрацията.



Фиг.29. Стимулиращ/инхибиращ ефект на *Porphyridium aeruginum* HINDAK 1983/2 и *Chlorella vulgaris* RJ1 върху общата дължина на кълновете на *Lactuca sativa*. Обозначенията са като на фиг.25.

Сравнението между шамовете на двата вида показва, че *C. vulgaris* RJ1 има по-силен общ ефект върху надземния растеж, докато при *P. aeruginum* HINDAK 1983/2 се наблюдава по-ясно функционално разделение между формулировките – биомасата стимулира предимно корена, а вариантите, богати на екзометаболити, стимулират по-силно надземните части. При шам RJ1 ефектът е по-изразен при ниски концентрации и е свързан главно с клетъчните компоненти, което насочва към водеща роля на втърклетъчни

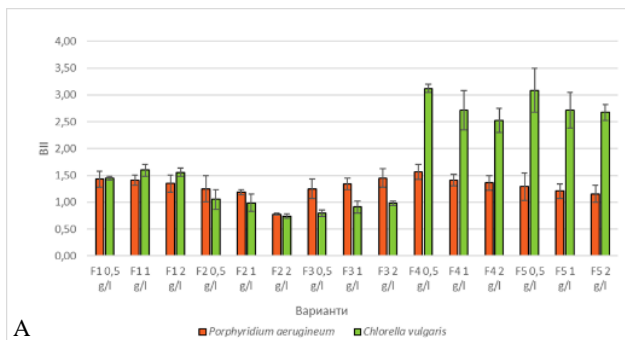
растежни фактори. При щам HINDAK 1983/2 биостимулиращото действие е по-комплексно, тъй като в растежния отговор участват както ендогенни, така и екзогенни метаболити.

6.3. Анализ на ефекта върху биомасата и жизнеността на кълновете

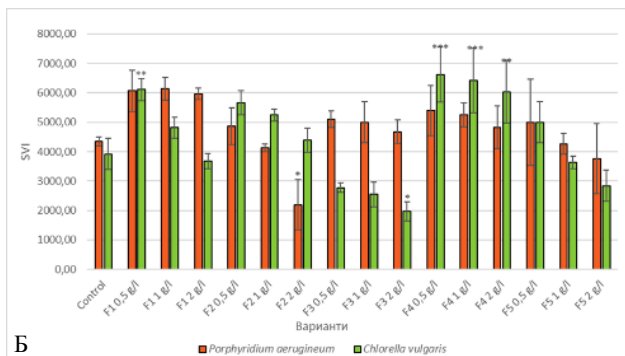
Всички изследвани варианти на *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 повишават биомасата на разсада от *L. sativa*. Най-силно изразен ефект е наблюдаван при концентрация 0.5 g/l с цяла клетъчна култура, дезинтегрирана клетъчна култура и биомаса като се достига до стойности на ВП (индекс за подобряване на биомасата) съответно 1.43, 1.51 и 1.56; (Фиг.30 -А). При *C. vulgaris* RJ1 най-силно стимулиране на биомасата е установено при третирането с биомаса и дезинтегрирана биомаса, особено при 0.5 g/l биомаса, където ВП достига 3.11, съответствайки на приблизително 210% увеличение спрямо контролата (Фиг.30 -А).

Индексът на жизненост на разсада (SVI) следва тенденции, сходни с тези, наблюдавани при покълването и натрупването на биомаса (Фиг.30-Б). При *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 най-висока стойност на SVI – 6145 е отчетена при прилагането на цяла клетъчна култура в концентрация 1 g/l, в сравнение с 4343 при контролата. Супернатанта и биомасата също показват повишени стойности на SVI. При *C. vulgaris* RJ1 биомасата при концентрация 0.5 g/l води до най-висок индекс на жизненост (6622 спрямо 3919 при контролата), което показва силно стимулиране на общото развитие на разсада. За разлика от това, супернатанта последователно намалява стойностите на индекса при всички изследвани концентрации.

Тъй като индексът на жизненост на разсада (SVI) обединява както покълването, така и растежа на младите растения, неговото увеличение потвърждава, че приложението на вариантите от микроводораслови култури подобрява не само ранното поникване, но и общото развитие на разсада.



А



Б

Фиг 30. Ефект на *Porphyridium aeruginеum* HINDAK 1983/2 и *Chlorella vulgaris* RJ1 върху натрупването на биомаса (А) и индекса на жизненост (SVI) (Б) при кълновете на *Lactuca sativa*. Обозначенията са като на фиг.25.

Обобщено, резултатите показват, че както *C. vulgaris* RJ1, така и *P. aeruginеum* HINDAK 1983/2 действат като широкоспектърни биостимуланти при концентрация 0.5 g/l, като щам RJ1 функционира основно като хормонален и метаболитен активатор, докато щам HINDAK 1983/2 действа като комбиниран клетъчно-екзосметаболитен стимулатор.

7. Анализ на ефекта на *Chlorella vulgaris* RJ1 и *Porphyridium aeruginum* HINDAK 1983/2 върху растежа и развитието на домати *Solanum lycopersicum*

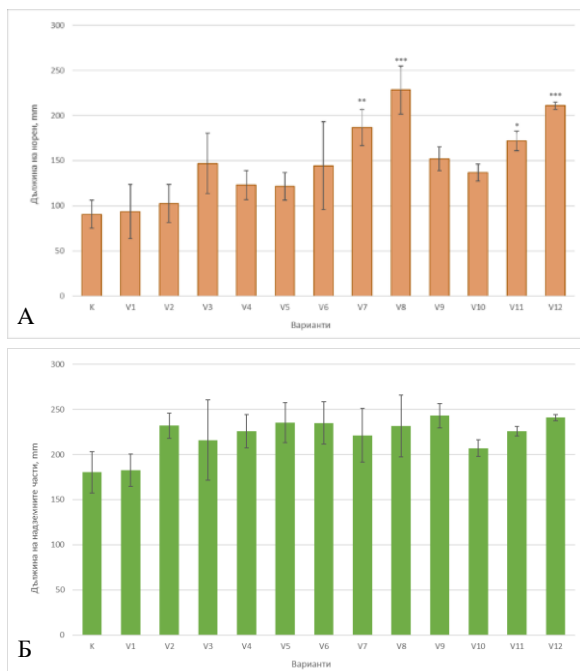
За оценка на биостимулиращия потенциал на изследваните от нас щамове върху цели растения е анализиран ефектът на 12 подбрани варианта върху биометрични и физиологични показатели, обуславящи развитието на *Solanum lycopersicum*.

7.1. Анализ на ефекта върху биометричните параметри

По показателя дължина на корен, всички третирани варианти, с изключение на минималното повишение при *C. vulgaris* RJ1 биомаса 0.5 g/l, превишават контролната стойност от 90.67 mm, което показва обща положителна насоченост на ефекта върху кореновото развитие (Фиг. 31-А). Най-висока стойност е отчетена при *P. aeruginum* HINDAK 1983/2 дезинтегрирана биомаса 1 g/l – 228.33 mm, което представлява увеличение с 151.8% спрямо контрола. Много близки по интензитет са и вариантите *P. aeruginum* HINDAK 1983/2 супернатант 1 g/l – 211.00 mm (+132.7%) и дезинтегрирана биомаса 0.5 g/l – 187.00 mm (+106.2%). При вариантите с *C. vulgaris* RJ1 кореновият растеж също се стимулира, но в по-умерена степен, като най-добър резултат е установен при супернатант 0.5 g/l – 152.00 mm (+67.6%), следван от дезинтегрирана биомаса 0.5 g/l – 147.00 mm (+62.1%). Данните показват ясно превъзходство на *P. aeruginum* HINDAK 1983/2, особено при приложение като дезинтегрирана биомаса или супернатант, което насочва към ключова роля на освободените и екзосекретирани метаболити за стимулиране на кореновата система.

Надземната част също реагира положително на третирането, като всички варианти превишават контролната стойност от 180.33 mm (Фиг.31-Б). Най-висока стойност е установена при *C. vulgaris* RJ1 биомаса 0.5 g/l – 243.00 mm, което съответства на увеличение с 34.8% спрямо контрола. Много близки резултати са отчетени при *P. aeruginum* HINDAK 1983/2 супернатант 1 g/l – 241.00 mm (+33.6%), биомаса 0.5 g/l – 235.33 mm (+30.5%), биомаса 1 g/l – 235.00 mm (+30.3%) и *C. vulgaris* RJ1 биомаса 1 g/l – 232.00 mm (+28.7%). Наблюдава се интересна особеност: при *C. vulgaris* RJ1 супернатант в по-ниска концентрация (0.5 g/l) превъзхожда съответния 1% вариант, което насочва към

дозозависим отговор. За *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 ефектът върху надземния растеж е по-равномерно изразен между биомаса и супернатант, без рязък спад при по-високата концентрация.



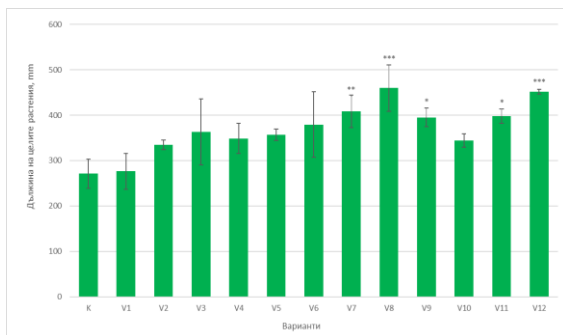
Фиг. 31. Ефект на всички тествани варианти върху дължината на корена (А) и надземните части (Б) на *Solanum lycopersicum*.

V1, V2, V5 и V6 – Биомаса; V3, V4, V7 и V8 – Дезинтегрирана биомаса; V9 – V12 – Супернатант.

V1, V3 и V9 – *C. vulgaris* RJ1, 0.5 g/l; V2, V4 и V10 – *C. vulgaris* RJ, 1 g/l; V5, V7 и V11 – *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2, 0.5 g/l; V6, V8 и V12 – *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2, 1 g/l. Стойностите са представени като средна стойност ± стандартно отклонение (n = 3). Звездичките означават статистически значими различия спрямо контролата (Tukey HSD: * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001).

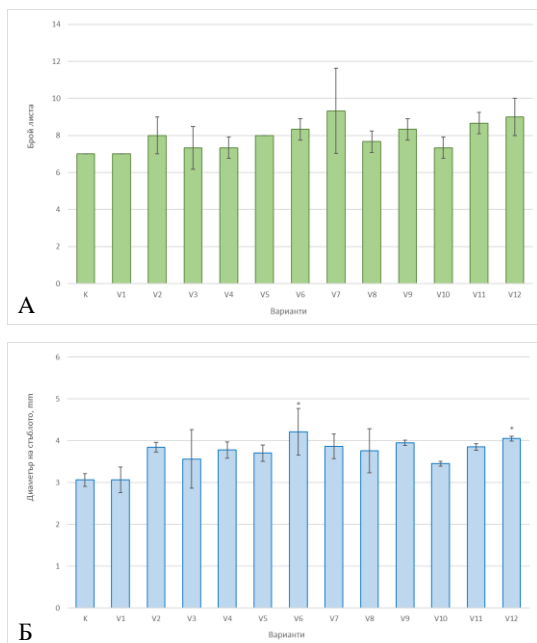
Показателят „дължина на цели растения“ интегрира ефекта върху кореновата и надземната част и носи информация за цялостния растежен отговор. Контролата е с обща дължина 271.00 mm, докато всички третирани варианти показват по-високи стойности. Максимумът е отчетен при *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 дезинтегрирана биомаса 1 g/l – 460.00 mm, което е увеличение с 69,7% спрямо контрола. Следват *P. aeruginosa*

HINDAK 1983/2 супернатант 1 g/l – 452.00 mm (+66.8%), дезинтегрирана биомаса 0.5 g/l – 408.33 mm (+50.7%), супернатант 0.5 g/l – 398.00 mm (+46.9%) и *C. vulgaris* RJ1 биомаса 0.5 g/l – 395.00 mm (+45.8%) (Фиг. 32). Тези резултати показват, че най-силен интегрален ефект върху растежа се получава при вариантите с *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2, особено при дезинтегрирана биомаса и супернатант, докато при *C. vulgaris* RJ1 най-ефективен е супернатантът, и то в по-ниската концентрация.



Фиг.32. Ефект на всички тествани варианти върху дължината на целите растения. Обозначенията са като на фиг.31.

По отношение на образуването на листа, контролните растения формират средно 7.00 броя. Най-висока стойност е отчетена при *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 дезинтегрирана биомаса 0.5 g/l – 9,33 листа, което означава увеличение с 33.3% спрямо контролата (Фиг.33-А). Високи стойности са установени и при HINDAK 1983/2 супернатант 1 g/l – 9,00 листа (+28.6%), супернатант 0.5 g/l – 8.67 листа (+23.9%), биомаса 1 g/l и *C. vulgaris* RJ1 супернатант 0.5 g/l – по 8.33 листа (+19,0%). Диаметърът на стъблото е важен индикатор за морфологична устойчивост и вегетативна мощност. Контролните растения са със среден диаметър 3.06 mm, докато всички третиращи варианти показват по-високи или равни стойности. Най-висок диаметър е измерен при *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 биомаса 1 g/l – 4.21 mm, което представлява увеличение с 37.6%. Следват *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 супернатант 1 g/l – 4.05 mm (+32.4%), *C. vulgaris* RJ1 супернатант 0.5 g/l – 3.95 mm (+29,1%), *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 дезинтегрирана биомаса 0.5 g/l – 3.86 mm (+26.1%) и супернатант 0.5 g/l – 3.85 mm (+25.8%) (Фиг.33-Б).



Фиг. 33. Ефект на всички тествани варианти върху броя на напълно развитите листа (А) и диаметъра на стъблото (Б). Обозначенията са като на фиг.31.

7.2. Анализ на ефекта върху биомасата

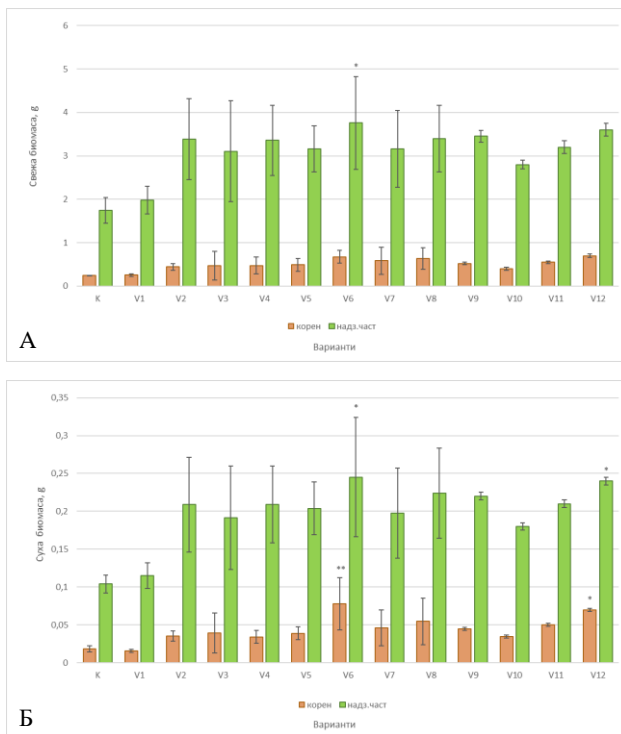
Свежата биомаса на корена демонстрира една от най-ясните реакции към приложените третириания. При контролните растения тя е 0.24 g, докато при всички варианти с *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 стойностите са повече от два пъти по-високи. Най-висока свежа коренова биомаса е отчетена при *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 супернатант 1 g/l – 0.70 g (+191.7%), много близка до биомаса 1 g/l – 0.68 g (+183.3%), дезинтегрирана биомаса 1 g/l – 0.63 g (+162.5%) и дезинтегрирана биомаса 0.5 g/l – 0.59 g (+145.8%). При *C. vulgaris* RJ1 най-добър резултат е установен при супернатант 0.5 g/l – 0.52 g (+116.7%) (Фиг. 34-А).

Свежата биомаса на надземната част при контролата е 1.75 g. Всички третирани варианти показват съществено увеличение, като най-високата стойност е отчетена отново

при *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 биомаса 1 g/l – 3.76 g, което представлява нарастване с 114.9% спрямо контролата. Следват *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 супернатант 1 g/l – 3.60 g (+105.7%), *C. vulgaris* RJ1 супернатант 0.5 g/l – 3.45 g (+97.1%), биомаса 1 g/l и *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 дезинтегрирана биомаса 1 g/l – по 3.39 g (+93.7%) (Фиг.34-А). Вижда се, че както *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2, така и *C. vulgaris* RJ1 могат силно да стимулират натрупването на свежа надземна маса, но най-изразен ефект се постига от биомаса и супернатант на *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 при 1%.

Сухата коренова биомаса е един от най-надеждните показатели за реално натрупване на структурен материал. Контролната стойност е 0.019 g, а при всички третирани варианти, с изключение на *C. vulgaris* RJ1 биомаса 0.5 g/l, се наблюдава отчетливо увеличение. Най-висока стойност е отчетена при *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 биомаса 1 g/l – 0.078 g, което е увеличение с 310.5% спрямо контролата. Следват *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 супернатант 1 g/l – 0.070 g (+268.4%), дезинтегрирана биомаса 1 g/l – 0.055 g (+189.5%), супернатант 0.5 g/l – 0.050 g (+163.2%) и дезинтегрирана биомаса 0.5 g/l – 0.046 g (+142.1%) (Фиг.34-Б). Най-добрият вариант при *C. vulgaris* RJ1 е супернатант 0.5% – 0.045 g (+136.8%).

Сухата биомаса на надземната част в контролните растения е 0.104 g, докато при всички третирани варианти е регистрирано повишение. Максималната стойност е измерена при *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 биомаса 1 g/l – 0.245 g (+135.6%), следвана от супернатант 1 g/l – 0.240 g (+130.8%), дезинтегрирана биомаса 1 g/l – 0.224 g (+115.4%), *C. vulgaris* RJ1 супернатант 0.5 g/l – 0.220 g (+111.5%), както и биомаса 1 g/l и дезинтегрирана биомаса 1 g/l – по 0.209 g (+101.0%) (Фиг.34-Б).



Фиг.34. Ефект на всички тествани варианти върху свежата (А) и сухата (Б) биомаса на корените и надземните части. Обозначенията са като на фиг.31.

7.3. Обобщен анализ на биометричните показатели и биомасата

В обобщение, получените резултати дават основание да се приеме, че изследваните шамове и на двата изследвани микроводораслови вида притежават практически приложим потенциал като биостимуланти за домати, но *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 показва по-ясно изразено преимущество по отношение на кореновото развитие и акумулацията на биомаса, докато *C. vulgaris* RJ1 демонстрира по-добра ефективност в отделни варианти, свързани основно със супернатанта.

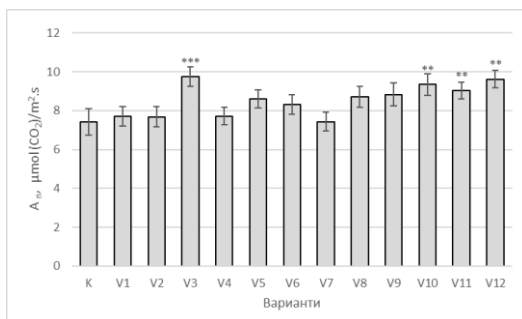
7.4. Анализ на ефекта върху физиологичните параметри на растенията

Настоящият раздел представя анализ на влиянието на приложените експериментални варианти върху основните физиологични параметри на доматените растения, с цел да се оцени тяхното въздействие върху фотосинтетичната активност, пигментния статус и общото функционално състояние на растенията.

Физиологичният профил на доматените растения показва, че различните варианти на третиране повлияват в различна степен отделните физиологични показатели. Най-силно се променят нетната фотосинтетична скорост (A_N), която показва колко активно протича фотосинтезата, и съдържанието на хлорофил (CHL), което е свързано със състоянието на фотосинтетичния апарат. По-слаби различия се наблюдават при транспирацията (E), която отразява загубата на вода през листата, при ефективността на използване на водата (WUE), както и при индекса NDVI.

Нетна фотосинтетична скорост (A_N)

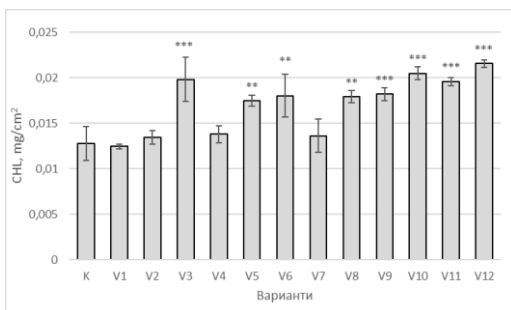
При анализа на нетната фотосинтетична скорост контролният вариант поддържаше средна стойност $7.43 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Най-изразено повишение е регистрирано при *S. vulgaris* RJ1 дезинтегрирана биомаса $0.5 \text{ g/l} - 9,74 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, което представлява увеличение с 31.2% и е статистически много силно значимо (***) . Високи стойности са отчетени и при *P. aeruginum* HINDAK 1983/2 супернатант $1 \text{ g/l} - 9,62 (+29,6\%; **)$, *S. vulgaris* RJ1 супернатант $1 \text{ g/l} - 9,35 (+25.9\%; **)$, както и при *P. aeruginum* HINDAK 1983/2 супернатант $0.5 \text{ g/l} - 9,02 (+21.5\%; **)$ (Фиг. 35).



Фиг.35. Анализ на ефекта на изследваните варианти върху нетната фотосинтетична скорост (A_N) на тест растението *Solanum lycopersicum*. Обозначенията са като на фиг.31.

Съдържание на хлорофил (CHL)

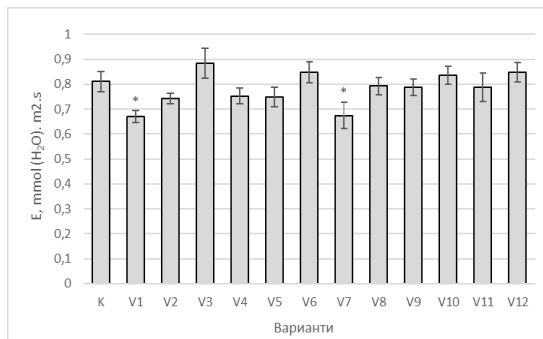
Съдържанието на хлорофил е показателят, при който влиянието на третирането се откроява най-ясно. При контролните растения стойността е 0.0128 mg/cm^2 , а най-високото ниво е установено при *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 супернатант $1 \text{ g/l} - 0.0216 \text{ mg/cm}^2$, което представлява увеличение с $69,2\%$ спрямо контрола (***) . Много близки резултати са отчетени и при *C. vulgaris* RJ1 супернатант $1 \text{ g/l} - 0.0205 \text{ mg/cm}^2 (+60.8\%; ***)$, дезинтегрирана биомаса $0.5 \text{ g/l} - 0.0198 \text{ mg/cm}^2 (+55.6\%; ***)$, *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 супернатант $0.5 \text{ g/l} - 0.0196 \text{ mg/cm}^2 (+53.7\%; ***)$ и *C. vulgaris* RJ1 супернатант $0.5 \text{ g/l} - 0.0182 \text{ mg/cm}^2 (+42.7\%; ***)$ (Фиг.36). Значимо повишение се наблюдава и при вариантите с *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 биомаса и дезинтегрирана биомаса, докато само *C. vulgaris* RJ1 биомаса 0.5 g/l и дезинтегрирана биомаса 1 g/l остават близо до контролните стойности.



Фиг.36. Анализ на ефекта на изследваните варианти върху съдържанието на хлорофил (CHL) на тест растението *Solanum lycopersicum*. Обозначенията са като на фиг.31.

Транспирация (E)

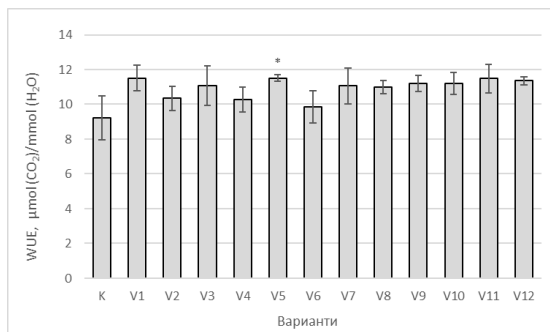
Транспирацията се повлиява в по-ограничена степен. Контролата е $0.810 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, а статистически значимо понижение се наблюдава само при *C. vulgaris* RJ1 биомаса Б $0.5 \text{ g/l} - 0.670 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1} (-17.3\%; *)$ и при *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 дезинтегрирана биомаса $0.5 \text{ g/l} - 0.675 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1} (-16.7\%; *)$ (Фиг.37).



Фиг.37. Анализ на ефекта на изследваните варианти върху скоростта на транспирация (E) на тест растението *Solanum lycopersicum*. Обозначенията са като на фиг.37.

Ефективност на използване на водата (WUE)

Ефективността на използване на водата дава по-интегрална представа за физиологичния отговор, тъй като свързва въглеродната фиксация с транспирационните загуби. Контролните растения имат най-ниска WUE – 9,20 $\mu\text{mol CO}_2/\text{mmol H}_2\text{O}$. Най-висока стойност е отчетена при *P. aeruginosum* HINDAK 1983/2 биомаса 0.5 g/l – 11.51 (+25.0%; *), следвана от *C. vulgaris* RJ1 биомаса Б 0.5 g/l – 11.50 (+25.0%), *P. aeruginosum* HINDAK 1983/2 супернатант 0.5 g/l – 11.49 (+24.8%) и 1 g/l – 11.35 (+23.4%), както и *C. vulgaris* RJ1 супернатант 0.5 g/l – 11.19 (+21.6%) (Фиг.38).



Фиг.38. Анализ на ефекта на изследваните варианти върху ефективността на използване на водата (WUE) на тест растението *Solanum lycopersicum*. Обозначенията са като на

Фиг.31

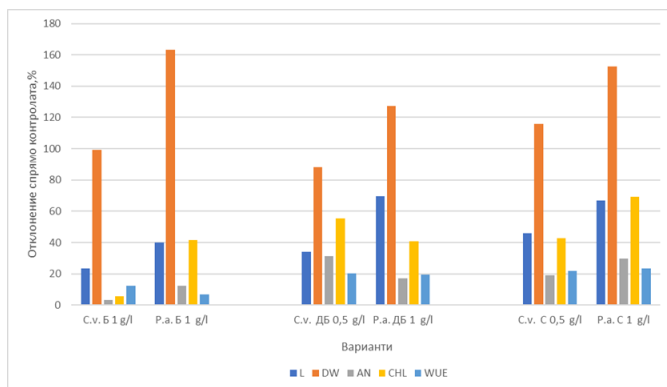
Нормализиран диференциален вегетационен индекс (NDVI)

NDVI показва най-малка вариабилност между вариантите. Стойностите бяха в тесен интервал между 0.678 и 0.721, без статистически значими различия.

Физиологичният анализ показва, че най-изразеният и най-последователен ефект на третиранията с микроводорасли при домати е свързан с подобряване на хлорофилния статус, а в по-ограничена, но също важна степен – с повишаване на нетната фотосинтетична скорост и на WUE. Най-силен физиологичен ефект проявяват *C. vulgaris* RJ1 дезинтегрирана биомаса 0.5% и супернатантите, особено *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 супернатант 1%, което показва, че освободените вътреклетъчни и извънклетъчни метаболити имат висока физиологична активност от цялата биомаса.

7.5. Обобщен анализ на биометричните и физиолого-биохимичните ефекти на биомасата, ендо- и екзометаболитите,

Обобщеният анализ на резултатите показва, че биостимулиращият ефект на изследваните микроводораслови продукти при *S. lycopersicum* зависи не само от вида на микроводораслите, но и в много голяма степен от формата на приложения продукт – цяла биомаса, дезинтегрирана биомаса или супернатант, както и от използваната концентрация. Данните от биометричните, биомасовите и физиологичните показатели показват, че при *C. vulgaris* RJ1 най-активни са вариантите, свързани с освободени вътреклетъчни и извънклетъчни метаболити, докато при *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 силен ефект има както цялата биомаса, така и дезинтегрираната биомаса и супернатанта при 1 g/l. Това разграничение вероятно отразява различия в метаболитната специализация на щамовете на двата вида. При *C. vulgaris* RJ1, по-важни за биостимулирането вероятно са разтворимите клетъчни компоненти и нискомолекулните сигнали, докато при *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 по-голяма роля играят екзополisahаридите и въглехидратните/полизахаридни комплекси, които по-осезаемо повлияват кореновата система и акумулацията на биомаса.



Фиг.39. Обобщаваща графика на процентното положително отклонение на основни показатели спрямо контролата при вариантите представили комплексен ефект върху биометричните, биохимичните и физиологични показатели.

L-дължина на целите растения, DW – суха биомаса на целите растения, AN – нетна фотосинтетична скорост, CHL - съдържание на хлорофил, WUE - ефективност на използване на водата; Представените варианти са биомаса (Б), дезинтегрирана биомаса (ДБ) и супернатант (С).

В обобщение, резултатите показват, че най-подходящите варианти за последваща практическа оценка и формулиране на биостимулиращи продукти са: биомаса 1 g/l, дезинтегрирана биомаса 0.5 g/l и супернатант 0.5 g/l при *C. vulgaris* RJ1 както и биомаса 1 g/l, дезинтегрирана биомаса 1 g/l и супернатант 1 g/l при *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2. Тази селекция показва, че при разработването на микроводораслови биостимуланти не е достатъчно да се избира само „по-добрият вид“, а трябва да се оптимизират едновременно видът, формулировката и концентрацията, тъй като именно тяхната комбинация определя крайния физиологичен и растежен ефект върху растенията.

Получените резултати очертават перспективен приложен потенциал на изследваните щамове *C. vulgaris* RJ1 и *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 като източник на микроводораслови биостимуланти при лабораторни условия, като за практическа валидация са необходими допълнителни изпитвания при повече растителни видове и в условия, близки до реалната агрономична практика.

ИЗВОДИ

1. *C. vulgaris* и *P. aeruginosa* показват добър потенциал за култивиране в лабораторни условия и ефективно натрупване на биомаса. *C. vulgaris* RJ1 се характеризира с по-интензивно клетъчно делене в експоненциалната фаза на растеж, докато при *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 растежът е по-плавен и равномерен.
2. Установена е ясно изразена метаболитна специализация на двата вида - *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 натрупва значително по-високи количества въглехидрати и многократно повече екзополisahариди, докато *C. vulgaris* RJ1 формира биомаса с високо белтъчно съдържание. Пигментният профил допълнително разграничава двата щама и предполага различна функционална насоченост.
3. Клетъчните екстракти от *C. vulgaris* RJ1 се характеризират с по-високи нива на полифеноли и флавоноиди и по-изразена антиоксидантна активност (FRAP и ABTS), което показва потенциала му като източник на вътреклетъчни антиоксиданти, докато при *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 значима част от антиоксидантната активност е изнесена в секретираниите извънклетъчни полисахариди.
4. *C. vulgaris* RJ1 се характеризира с по-широк ензимен профил от този на *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2, който включва и левцин-ариламидазна активност, което предполага по-висок потенциал за участие в разграждането на органични азотсъдържащи субстрати.
5. LC-MS/MS анализът показва различия в хормоналния профил на двата вида - при *C. vulgaris* RJ1 доминират IAA, JA и GA_s, докато при *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 се наблюдава преобладаване на ABA и по-високи нива на GR5, което отразява различни стратегии на биостимулиращо действие.
6. Дезинтеграцията под налягане е ефективен метод и за двата вида, като се наблюдава изразена видова специфичност. *C. vulgaris* RJ1 проявява по-висока податливост към разрушаване, докато *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 показва по-висока устойчивост при по-ниски налягания. При налягане от 700 bar се постига над 90% дезинтеграция и при двата щама.

7. Двата изследвани щама микроводорасли стимулират кълняемостта и ранното развитие на *L. sativa*, като ефектът е зависим от вида и формулировката. При *C. vulgaris* RJ1 най-силен ефект има биомасата при 0.5 g/l, докато при *P. aeruginum* HINDAK 1983/2- цялата клетъчна култура при същата концентрация.
8. При доматените растения (*S. lycopersicum*) двата вида проявяват изразен биометричен ефект. *P. aeruginum* HINDAK 1983/2 (1 g/l) има по-силен ефект върху кореновото развитие и натрупването на биомаса, докато *C. vulgaris* RJ1 проявява по-умерен, но стабилен ефект, като най-ефективен е вариантът със супернатанта при 0.5 g/l.
9. Биостимулиращият ефект при *S. lycopersicum* е отчетливо зависим от вида микроводорасло, приложената експериментална формулировка и концентрацията. Най-силен общ ефект върху физиологичните показатели, кореновото развитие и биомасата показва *P. aeruginum* HINDAK 1983/2, приложен като дезинтегрирана биомаса и супернатант при 1 g/l. При *C. vulgaris* RJ1 най-ефективни са дезинтегрираната биомаса при 0.5 g/l и супернатантът при 0.5 g/l.
10. Ниските концентрации (0.5 g/l) при повечето варианти на третиране водят да по-силен стимулиращ ефект както при семена, така и при растения, в сравнение с по-високите дози, което съответства на хорметичен тип на отговор.
11. Двата вида микроводорасли показват различна функционална насоченост на биостимулиращия ефект - *C. vulgaris* RJ1 като източник на белтъчна и биологично активна биомаса, а *P. aeruginum* HINDAK 1983/2 като източник на екзополisahариди и високо активен супернатант.
12. Биологичният ефект на *C. vulgaris* RJ1 и *P. aeruginum* HINDAK 1983/2 се определя от цялостното влияние на вида микроводорасло, типа и концентрацията на приложени микроводораслов разтвор, както и от вида на тест растението и фенологичната фаза на развитие, което потвърждава необходимостта от прецизна оптимизация при разработването на микроводораслови биостимуланги.

ПРИНОСИ

1. Разработена и приложена е цялостна сравнителна експериментална схема за оценка на биологичната активност на *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 и *S. vulgaris* RJ1, включваща анализ на биомаса, ендо- и екзометаболити в три концентрационни диапазона при семена от *L. sativa* и растения от домати (*S. lycopersicum*), която може да бъде използвана и за бъдещи анализи на биологична активност на фракции и концентрации при други микроводорасли.
2. За първи път е изследван биостимулиращият потенциал на вида *Porphyridium aeruginosa* по отношение на ефекта му върху растежа и развитието на растенията.
3. Антиоксидантната активност на биомасата на *S. vulgaris* RJ1 и на екзополisahаридите на *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 създават предпоставка за тестване на приложението им като продукти за стимулиране на стресоустойчивостта на растителните видове. Резултатите разграничават и възможности за целенасочено използване на различните метаболитни фракции от двете микроводорасли в сферата на медицината, фармацията и други сфери на биотехнологиите.
4. Доказаният видово-, формулационно- и дозозависим ефект върху кълняемостта и ранното развитие на *L. sativa* при ниски концентрации на двете водорасли поставя основата за разработване на ефективни и целево ориентирани микроводораслови биостимуланти за стимулиране на ранното растително развитие и повишаване на устойчивостта на културите.
5. Установеното диференцирано влияние на *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 и *S. vulgaris* RJ1 върху биометричните показатели при домати (*S. lycopersicum*), създава основа за разработването на целево ориентирани биостимулиращи продукти, насочени към специфични органи на растенията.
6. Доказано е, че физиологичният статус на доматиените растения се повлиява по различен начин в зависимост от вида, формулировката и концентрацията на приложените микроводораслови продукти, като вариантите с комплексно действие създават основата за разработване на листово приложими микроводораслови

биостимуланти с ефект върху пигментния комплекс и физиологичния статус на надземната част при домати.

7. Оптимизирани са условията за дезинтеграция на биомасата на двата изследвани микроводораслови щама чрез хомогенизация под налягане и е установена видова специфичност на процеса. При еднакви условия *S. vulgaris* RJ1 показва по-висока степен на дезинтеграция от *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2, а налягането се откроява като по-важен фактор отколкото времето на обработка. Това създава технологична основа за получаване на активни микроводораслови дезинтегратори с приложение в земеделието и други сфери на биотехнологиите.

ПУБЛИКАЦИИ

1. **Deleva, V.**, Georgieva G., Lozanova, V., & Ivanova, J. Biostimulant potential of microalgae *Porphyridium aeruginum* and *Chlorella vulgaris* on germination and early growth of *Lactuca sativa*. Bulgarian Journal of agriculture, Accepted for Issue 6/2027 - Q3
2. **Ivanova, J. G.**, Toshkova-Yotova, T. S., Toshkova, R. A., **Deleva, V. R.**, Georgieva, A. K., & Gigova, L. G. (2024). Antioxidant and Anticancer Potential of Extracellular Polysaccharide from *Porphyridium aeruginum* (Rhodophyta). *Fermentation*, 10(5), 259. - Q2

УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ

Постери:

Deleva, V., Ivanova, J., Badalova, M., Georgieva, G., Zaharieva, E. (2024). Evaluation of biological effect of *Chlorella vulgaris* and *Porphyridium aeruginum* on *Lactuca sativa* seeds International Agricultural, Biological and Life Science Conference AGBIOL 18.09.2024-20.09.2024 Edirne, Turkey

Deleva, V., Toshkova-Yotova, T., Ivanova, J., Badalova, M., (2023). Effect of green algae *Coelastrella* sp.* on germination of seeds from monocots and dicots class. International Conference "Kliment's days 2023 - 60 Years Faculty of Biology" 09.11.2023 - 11.11.2023 Sofia, Bulgaria

(*Lately in my work the *Coelastrella* sp., was identified as *Chlorella vulgaris*)

Доклади:

Deleva, V., Ivanova, J., Agayn-Stoyanova, N., (2025). Microalgae in sustainable agriculture. First International Conference of Functional Biology FUNBIO 10.09.2025 - 12.09.2025 St.st. Constantine and Helena, Bulgaria

Deleva, V., (2025). Биоактивни метаболити от микроводорасли и тяхната роля в развитието на устойчиви земеделски системи. Представяне на изследователски направления "Биохимия" и "Физиология на растенията" в ИФРГ-БАН 27.11.2025, София, България

ЗАБЕЛЯЗАНИ ЦИТИРАНИЯ

Статия:

1. **Ivanova, J. G.,** Toshkova-Yotova, T. S., Toshkova, R. A., **Deleva, V. R.,** Georgieva, A. K., & Gigova, L. G. (2024). Antioxidant and Anticancer Potential of Extracellular Polysaccharide from *Porphyridium aerugineum* (Rhodophyta). *Fermentation*, 10(5), 259. - Q2

Цитирана от:

1. Akter, F., Krishnan, L., Mestres, G., Gustafsson, J., Ralph, P. J., & Kuzhiumparambil, U. (2025). Physicochemical characterization and evaluation of the antioxidant potential of water-soluble polysaccharides from red microalgae, *Rhodomonas salina*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 310(3), 143417.
2. Akter, F., Songsomboon, K., Ralph, P. J., & Kuzhiumparambil, U. (2025). A comprehensive overview of microalgae- and cyanobacteria-derived polysaccharides: Extraction, structural chemistry, techno-functional and bioactive properties. *Bioresource Technology Reports*, 102280.
3. He, Y., Ji, L., Yuan, Y., Rui, D., Li, J., Cheng, P., Sun, L., & Fan, J. (2025). Recent advances in polysaccharide-dominated extracellular polymeric substances from microalgae: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 302, 140572.
4. Li, Y., & Chen, T. (2025). Study on the effect of extracellular polysaccharides of *Porphyra yezoensis* on improving the storage stability of aquatic feed. *Feed Research*, 48(17).
5. Ji, L., Zhao, C., He, Y., Yuan, Y., Hong, Z., Sun, L., & Fan, J. (2024). Exploring *Porphyridium purpureum* and *Porphyridium aerugineum* as alternative resources for phycobiliprotein production. *Bioresource Technology*, 131800.
6. Nasri, N., & Chavoshy, H. Z. (2025). Microalgae in medicine: Emerging therapeutic applications. *IntechOpen*.

7. Nguyen, A. Q., Mohammadi, M., Alian, M., Muralitharan, G., Chauhan, V. S., & Balan, V. (2024). Exploring the versatility of *Porphyridium* sp.: A comprehensive review of cultivation, bio-product extraction, purification, and characterization techniques. *Biotechnology Advances*, 108471.
8. Obluchinskaya, E. D., Pozharitskaya, O. N., Lapina, I. M., Kulminskaya, A. A., Zhurishkina, E. V., & Shikov, A. N. (2025). Comparative evaluation of dynamic maceration and ultrasonic assisted extraction of fucoidan from four Arctic brown algae on its antioxidant and anticancer properties. *Marine Drugs*, 23, 230.
9. Palaniappan, P., Surendirakumar, K., Ravi, M., & Ramesh, R. (2025). Exploring the effects of seaweed synthesized nanoparticles on human cancer cell lines. In *Cytotoxicity - A crucial toxicity test for in vitro experiments: Cytotoxicity: An essential assay for drugs, cosmetics, and medical devices*.
10. Ruiz Dávila, C. E. (2024). Development and evaluation of nano-vehicles for intranasal immunization based on hybridized microalgal polysaccharides. CONACYT National Repository.
11. Xu, S., Zhang, H., Feng, X., Li, B., Li, T., Su, W., & Wang, Y. (2025). Molecularly tailored strategies based on natural polysaccharide structural and functional benefits for precise nutrients delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, 147732.

