СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ“
БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ

SOFIA UNIVERSITY
St. KLIMENT OHRIDSKI
FACULTY OF BIOLOGY

КАТЕДРА ФИЗИОЛОГИЯ НА РАСТЕНИЯТА

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

към Д И С Е Р Т А Ц И Я

на тема:

Изследване на биологичния потенциал на цианопрокариоти и зелени микроводорасли за фикоремедиация на води, замърсени с тежки метали

Зорница Красимирова Карчева

Научен ръководител:
Доц. д-р Ганка Чанева

Ръководител катедра:
Доц. д-р Мирослава Жипонова

Биологически факултет
СУ „Св. Кл. Охридски“
2025

Дисертационният труд е написан на стандартни машинописни страници и съдържа следните раздели: **Въведение – 1 стр.**; **Литературен обзор – 35 стр.**; **Цел и задачи – 1 стр.**; **Материали и методи – 17 стр.**; **Резултати и обсъждане – 51 стр.**; **Изводи – 2 стр.**; **Приноси – 2 стр.** Включени са **30 фигури** и **12 таблици**. В литературната справка са отразени **332 заглавия**. Експерименталната работа е осъществена в Катедра Физиология на растенията и лаборатория по Физиология на растенията, катедра Дендрология, ЛТУ София.

Дисертационният труд е обсъден на заседание на катедрата по „Физиология на растенията“, Биологически факултет, СУ „Св. Климент Охридски“, проведено на …….2025г. от ……. часа и насрочен за защита пред научно жури, сформирано със заповед …….. на Ректора на СУ „Св. Климент Охридски“.

1. **доц. д-р Женя Петкова Йорданова –** Биологически факултет, СУ „Св. Кл. Охридски“
2. **доц. д-р Благой Ангелов Узунов –** Биологически факултет СУ „Св. Кл. Охридски“
3. **проф. д-р Венета Михова Капчина-Тотева –** пенсионер, СУ „Св. Кл. Охридски“
4. **проф. д-р Катя Маринова Георгиева –** ИФРГ, БАН
5. **доц. д-р Десислава Александрова Тодорова –** ИФРГ, БАН

За официални рецензенти са определени:

…….

……..

Защитата на дисертационния труд ще се състои на …… от…… часа в сградата на Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски“.

Материалите, свързани със защитата се намират в катедра „Физиология на растенията“ и на сайта на Биологически факултет.

Автор: Зорница Красмирова Карчева
Тема: Изследване на биологичния потенциал на цианопрокариоти и зелени микроводорасли за фикоремедиация на води, замърсени с тежки метали
Издателство: Хелиос Принт
Тираж: 30 бр.

СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ“
БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ

SOFIA UNIVERSITY
St. KLIMENT OHRIDSKI
FACULTY OF BIOLOGY

КАТЕДРА ФИЗИОЛОГИЯ НА РАСТЕНИЯТА

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

към Д И С Е Р Т А Ц И Я

на тема:

Изследване на биологичния потенциал на цианопрокариоти и зелени микроводорасли за фикоремедиация на води, замърсени с тежки метали

Зорница Красимирова Карчева

Научен ръководител:
Доц. д-р Ганка Чанева

Ръководител катедра:
Доц. д-р Мирослава Жипонова

Биологически факултет
СУ „Св. Кл. Охридски“
2025

Б Л А Г О Д А Р Н О С Т И

Изказвам благодарност на научния си ръководител доц. д-р Ганка Чанева за подкрепата и вярата в мен по време на разработването на настоящата дисертация.

Специална и безкрайна благодарност отправям към Жанета Георгиева – за нейната безкористна подкрепа, искрено приятелство и нестихващ ентусиазъм, с които превърна съвместната ни работа в истинско удоволствие. През годините тя беше не просто колега, а ценен партньор в един страхотен екип.

Благодарност отправям и към доц. д.н. Светослав Анев, ЛТУ София – за подкрепата и съдействието при реализирането на експерименталните анализи, както и за доверието, което ми оказа в ключов момент от моето развитие. Тази вяра беше истинско вдъхновение за мен.

Благодаря и на колегите от Катедра „Физиология на растенията“ БФ, СУ, както и към колегите от Лаб. „Експериментална и приложна алгология“, ИФРГ, БАН.

……..

Експерименталният труд е извършен в катедра “Физиология на растенията“ Биологически факултет,СУ „Св. Кл. Охридски“ и ЛТУ София

Експериментални дейности от настоящия дисертациоенен труд са разработени с помощта на изследователски проекти в подкрепа на докторанти:

„Възможности за приложение на перспективни щамове микроводорасли в процесите на фикоремедиация“

„Физиологичен отговор на кокултивационната система микроводорасло/висше растение срещу Zn *токсичност“*

У В О Д

Тежките метали представляват значима група устойчиви замърсители, натрупващи се в почвени и водни екосистеми в резултат на индустриализация, урбанизация и интензивна агротехническа дейност. Чрез торове, пестициди и неправилно управление на отпадъци, те навлизат в околната среда и предизвикват сериозни екологични и биологични последици. Токсичният им ефект се проявява на клетъчно и физиологично ниво, нарушавайки метаболизма, минералното хранене и клетъчната сигнализация в организмите. Растенията лесно абсорбират тежки метали, което води до оксидативен стрес, влошен растеж и намалена продуктивност. Особено уязвими са водните екосистеми, където основните продуценти – микроводораслите – са сред първите засегнати.

Микроводораслите, благодарение на простата си клетъчна структура, кратък жизнен цикъл и висока фотосинтетична активност, проявяват значителна устойчивост към метален стрес. Те могат да акумулират и трансформират токсични елементи, като запазват жизнените си функции. Това ги прави ценни както като биоиндикатори за екотоксикологични оценки, и ремедииращ потенциал. Те модифицират средата чрез метаболити, които ограничават проникването на замърсители, и активират антиоксидантни системи, предпазващи от клетъчни увреждания.

На тази основа се развива фикоремедиацията – иновативен, екологично щадящ метод за детоксикация на замърсени среди чрез микроводорасли. Процесът включва биосорбция и биоакумулация на тежки метали, при което микроводораслите действат като биологичен филтър. Макар и все още в експериментален етап, този подход показва потенциал за развитие на устойчиви и икономически ефективни технологии за пречистване. Особен интерес представлява изследването на нови щамове микроводорасли и оценката на физиологичния им отговор към различни нива и видове метален стрес. Тези данни са основа за прилагането им в съвместни култивационни системи – включително хидропонни – с цел едновременно ремедиация и стимулиране на растежа на висши растения.

Интеграцията на микроводорасли в хидропонни системи предлага перспективен модел за устойчиво земеделие. Те подпомагат растежа чрез метаболити, подобряват усвояването на хранителни вещества и намаляват екологичния отпечатък. По този начин се разширява ролята на микроводораслите в иновативни агроекологични технологии, насочени към устойчиво развитие и ресурсна ефективност.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия дисертационен труд е да се оцени капацитетът на стресовия отговор при два вида микроводорасли — *Arthronema africanum* (Cyanoprokaryota) и *Coelastrella* sp. BGV (Chlorophyta) — след експозиция на тежки метали, както и да се анализира влиянието на съвместно култивиране в моделна система микроводорасло/висше растение върху физиологичните параметри на растенията, третирани с различни концентрации на тежки метали.

За постигане на поставените цели е необходимо да се изпълнят следните експериментални **задачи**:

1. Скрининг на микроводораслови щамове – цианопрокариоти и зелени микроводорасли, включително и новоизолирани български щамове, с възможност за приложение във фикоремедиацията
2. Изследване на ефекта от тежкометалния стрес върху физиолого-биохимичните показатели на микроводораслите
3. Проследяване на ефекта на тежкометалния стрес върху антиоксидантната защитна система - промени в нивата на ключови нискомолекулни антиоксиданти и антиоксидантни ензими на микроводораслите
4. Анализ на физиологичния и биохимичния отговор на избрани микроводораслови щамове при експозиция на тежки метали в условия на моделна замърсена среда.
5. Кокултивиране на микроводорасли и висши растения върху моделни системи, замърсени с тежки метали
6. Проучване на физиологичния отговор на *Pisum sativum* RAN1 при кокултивиране на перспективните щамове микроводорасли с граха в моделни контролирани условия на тежкометален стрес.
7. Определяне на степента на акумулиране на тежкометалните йони в биомасата и на потенциала на микроводораслите като фикоремедиатори.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Разделът представя последователно и систематизирано подхода за изследване на физиологичния и биохимичния отговор на микроводораслите *Arthronema africanum* и *Coelastrella sp. BGV*, както и на висшето растение *Pisum sativum* L. *cv.* RAN1 в условията на тежкометален стрес и в моделни хидропонни системи за съвместно култивиране.

За култивирането на *A. africanum* (Schwabe & Simonsen), щам Lukavsky, 1981/01 (Komárek & Lukavský, 1988), са използвани 500 ml лабораторни съдове с аерация чрез стерилен въздух (100 l/h), обогатен с 2% CO_2. Културалната среда е Allen & Arnon, (1955) и Staub, (1961), адаптирана от Chaneva et al. (2007). Новоизолираният български щам *Coelastrella sp. BGV* е култивиран на течна среда по (Šetlik, 1966), модифицирана от Georgiev et al. (1978). Биомасата за експериментите, е събирана в края на експоненциалната фаза, с начална концентрация на инокулата 0.4 mg/ml абсолютно сухо тегло (DW).

Култивирането на *P. sativum* L. cv. RAN1 включва стерилизация на семена, прорастване в тъмнина и последващо прехвърляне в Knop среда, при фотопериод 16/8, температура 22–25 °C и светлинен поток 150 μmol m^{-2} s^{-1}. В етап на физиологично развит трети лист (около 168 часа) растенията се включват в хидропонните експерименти.

Физиологичният отговор към тежки метали (Cu, Cd, Pb) е проследен в концентрации 50 и 100 μmol, като Zn е изследван отделно при концентрации 2–15 mM, поради високия праг на толерантност на микроводораслите. Проби се вземат на 3, 7 и 10 ден (моделни водораслови системи) и на 3, 5 и 7 ден (кокултивационни системи).

Оценявани са биометрични и морфологични показатели чрез светлинна микроскопия (MRC-L3201 LED), растеж (по ACB), белтъчно съдържание (Lowry et al., 1951), хлорофили и каротеноиди (Mackinney, 1940), фикобилипротеини (Siegelman & Kycia, 1978), малондиалдехид (Dhindsa et al., 1981), пероксиди (Jessup, 1944), ензимна активност: каталаза (Aebi, 1984), пероксидаза (Hart et al., 1971), SOD (Beauchamp & Fridovich, 1971), както и газообменни параметри чрез инфрачервен анализатор LI-6400. NDVI и хлорофилно съдържание са измерени с PlantPen NDVI-300 и atLEAF+ (Novichonok et al., 2016). Минералният анализ е проведен чрез суха минерализация и атомно-абсорбционна спектроскопия (Perkin Elmer M-5000), фосфорът – колориметрично. Статистическият анализ включва ANOVA и Fisher LSD тест, с $n \geq 3$ биологични и технически повторения. Корелации и главни компоненти (PCA) са изчислени в R 4.4.1 чрез пакети *stats* и *ggbiplot*.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

ЧАСТ I: СТРЕСОВ ОТГОВОР НА МИКРОВОДОРАСЛИ

Микроводораслите са ключови първични продуценти във водните екосистеми и играят съществена роля в поддържането на биогеохимичното равновесие чрез участие в кръговрата на основни биогенни елементи. Благодарение на своята висока метаболитна пластичност и способност за адаптация към екологичен стрес, те представляват ценен модел за изследване на токсичността на различни замърсители, включително тежки метали. Наред с екологичната си функция, микроводораслите привличат внимание и поради своя биотехнологичен потенциал — способността им да синтезират биологично активни съединения и да натрупват токсични йони ги прави перспективни агенти за прилагане в стратегии за фикоремедиация.

Въпреки този потенциал, сравнително малко проучвания са фокусирани върху сравнителния стресов отговор на еволюционно различни микроводораслови таксони, подложени на токсично натоварване от тежки метали. Проучването на толерантността и физиологичната реакция към метали като мед, кадмий и олово е от съществено значение за разкриване на адаптационни механизми и за оценка на приложимостта на отделни видове в реални системи за биоремедиация.

В настоящата глава се представят експериментални резултати от две моделни микроводораслови системи, включващи щамове с различна еволюционна принадлежност — представител на цианопрокариотите (*A. africanum*) и зелено микроводорасло от клас *Chlorophyta* (*Coelastrella* sp. BGV). Изследването проследява физиологичния и биохимичен отговор на двата щама към третиране с тежки метали – Cu^{2+}, Cd^{2+} и Pb^{2+} – в концентрации 50 и 100 μmol, с цел да се установят видовоспецифични реакции и потенциална устойчивост към метален стрес.

1. Моделни експериментални системи за култивиране на микроводорасли в условия на тежкометален стрес предизвикан от Cu, Cd и Pb.

Ефектът на Cu, Cd и Pb се наблюдава в моделни експериментални системи, в които избраните щамове се култивират както следва:

а) 50 и 100 μM $CuSO_4$
б) 50 и 100 μM $CdCl_2$
в) 50 и 100 μM $(CH_3COO)_2Pb$

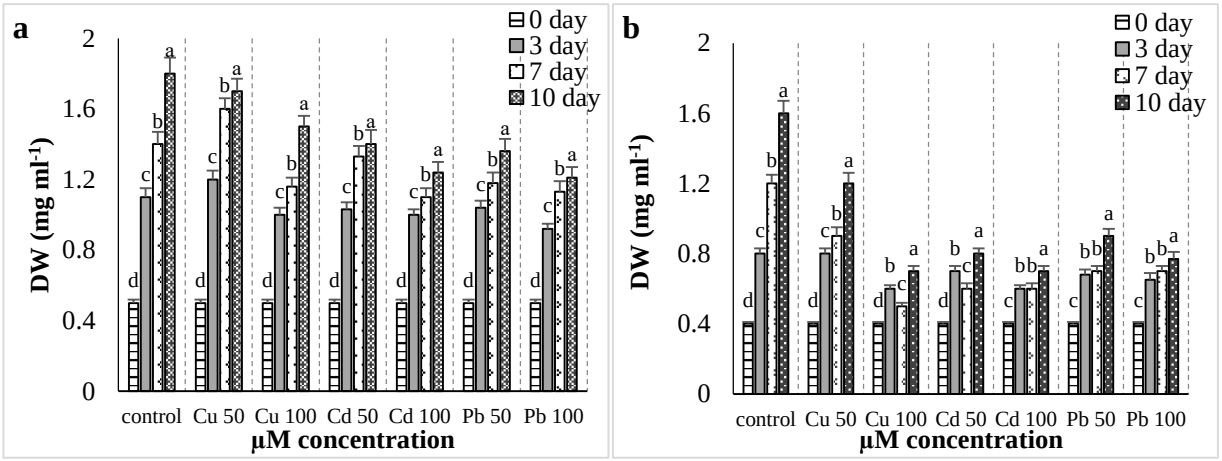
Суспензиите от водорасли се поддържат във фаза на експоненциален растеж. Експериментът е с продължителност 10 дни, като анализите се извършват на дни 0, 3, 7 и 10. Серията от концентрации на избрани тежки метали се тества за сравнение с нетретирани контроли.

2. Ефект на Cu, Cd и Pb върху растежа на *Coelastrella* sp. BGV и *A. africanum*.

Резултатите от проведените изследвания в моделните системи показват увеличаване в количеството на абсолютно сухо вещество (mg/ml) и при двата експериментални обекта. Въпреки това, добавянето на тежки метали потиска натрупването на биомаса в тестваните щамове в сравнение с контролните варианти.

Зеленото микроводорасло *Coelastrella* sp. BGV се повлиява от токсичното действие на тежките метали, но ефектът е по-слабо изразен в сравнение с отговора на цианопрокариота.

Най-силно потискане на растежа се наблюдава при високите концентрации на Cd^{2+} и Pb^{2+}, където сухата биомаса на водораслите намалява с 30%–33% в края на експерименталното третиране. При третиране с 50μM Cu^{2+} се наблюдава увеличаване на сухото тегло на 3-ти и 7-ми ден. Въпреки това, на 10-ти ден от експеримента, натрупването на биомаса се забавя и остава със 17% по-ниско от контролния вариант **(Фиг. 1a)**.



Фигура 1 Влияние на тежки метали върху АСВ (DW, mg ml-1) в биомасата на *Coelastrella* sp. BGV **(a)** и *A. africanum* **(b)** измерени на 0, 3, 7 и 10 ден след третиране.

Тестваните тежки метали инхибират растежа на *A. africanum*. Прилагането на високи концентрации Cu^{2+} и Cd^{2+} води до намаляване на половина на сухата биомаса с 55%–57% в сравнение с контролния вариант. В началните етапи на експеримента, на 3-

тия ден, третирането с ниски концентрации запазва нива сходни с контролните **(Фиг. 1b)**.

Морфологията на водорасловите клетки и жизнеспособността на суспензията са значително повлияни от обработката с тежките метали. В края на експерименталния период се наблюдава фрагментиране на нишките на *A. africanum* при третиране със 100μM Cd^{2+} и Pb^{2+}, докато в културата на *Coelastrella* sp. BGV се наблюдава аглутинация и натрупване на детрит. Данните показват, че високите концентрации на Cd и Pb водят до бързо развитие на едноклетъчни еукариотни микроорганизми и в двата щама, което може да е индикация за влошаване на състоянието на културата от водорасли.

За успеха на фикоремедиацията е необходимо подробно познаване на действието на тежкометалните замърсители и приложението на микроводораслите за този процес. Следователно, скринингът на обещаващи, бързо растящи щамове, способни да абсорбират тежки метали с висок афинитет, е от съществено значение.

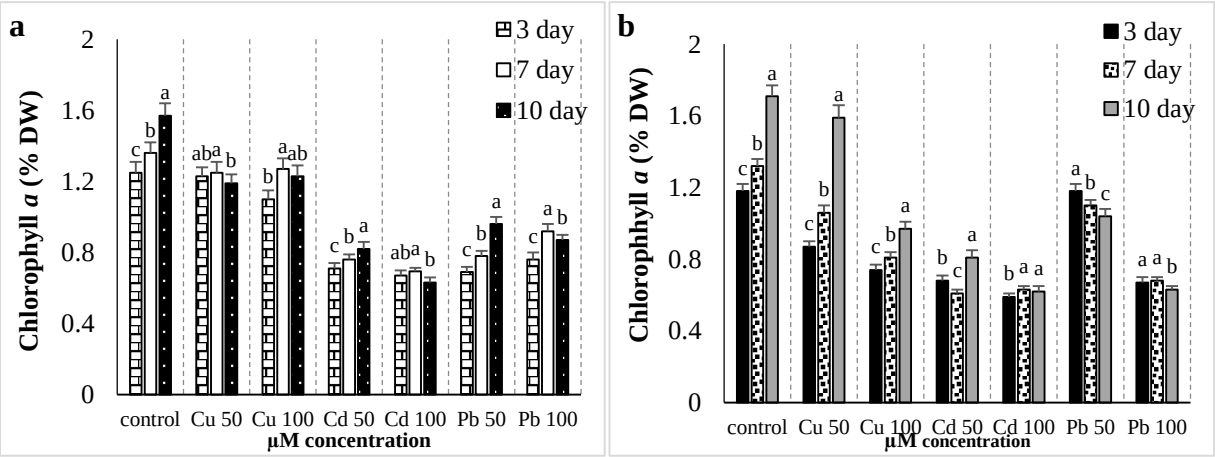
Проведените от нас експерименти установяват, че третирането с Cd^{2+} и Pb^{2+} силно инхибира растежа на *A. africanum* и *Coelastrella* sp. BGV, като ефектът е по-изразен при *A. africanum* **(Фиг. 1b)**. Тези тежки метали, приложени в концентрация от 100 μM, повлияват негативно на морфологията и влошават състоянието на културите от водорасли. За разлика от тях, ефектът на медта е по-слабо изразен. В началните етапи на експеримента мед в концентрация от 50 μM дори проявява известен стимулиращ ефект върху растежа, особено при *Coelastrella* sp. BGV **(Фиг. 1a)**. Предишни изследвания (Pham et al., 2020) също съобщават, че Cd и Pb силно инхибират растежа на зелените водорасли Scenedesmus sp., но този щам може ефективно да отстрани Cd, Pb и Cu при ниски концентрации. В проучване на (Marinova et al., 2018) се изследва ефектът на тежките метали Cu, Cd и Pb върху зелените водорасли *Scenedesmus incrassatulus* R-83, чрез добавянето им в хранителната среда. Резултатите показват, че тези метали значително влияят на физиологичните процеси и растежа на водораслите. (Al-Hasawi et al., 2020) анализира влиянието на тежките метали върху свободни и имобилизирани клетки на водораслото *Pseudokirchneriella subcapitata*. Изследването разкрива, че Cd инхибира растежа и на двата типа клетки. Освен това се наблюдава, че ниските концентрации на мед стимулират растежа на водораслите, но с увеличаването на концентрацията тази тенденция изчезва, което подчертава зависимостта на ефекта от дозата на метала. Carfagna et al. (2013) проучва ефекта на Cd и Pb върху *Chlorella sorokiniana* при концентрация от 250 μM. В това изследване се използват по-високи

концентрации, тъй като при по-ниски нива (50 и 100 μM) на Pb и Cd не се установяват значителни ефекти върху водораслите. При концентрация от 250 μM авторите отчитат понижаване на растежа към 24-ия час, значително намаляване на фотосинтетичната активност, както и редуциране на съдържанието на хлорофил и белтъци. Проучването заключава, че *C. sorokiniana* е чувствителна към тежките метали, като ефектът на Cd е по-силен в сравнение с Pb.

Обобщено, тези изследвания подчертават значителното влияние на тежките метали върху физиологичните параметри и растежа на различни видове микроводорасли, с ясно изразена зависимост от концентрацията и вида на метала.

3. Промени в пигментното съсържание (%DW) в биомасата на изследваните видове, след третиране с тежки метали

3.1. Промени в съдържанието на хлорофил *a*



Фигура 2 Влияние на тежки метали върху съдържанието на хлорофил *a* (%DW) в биомасата на *Coelastrella* sp. BGV **(a)** и *A. africanum* **(b)** измерени на 0, 3, 7 и 10 ден след третиране.

Оценката на пигментното съдържание като процент от сухата биомаса (% DW) позволява нормализиране на стойностите спрямо количеството клетъчен материал и елиминира вариациите, свързани с водното съдържание на пробите. Този подход осигурява по-голяма сравнимост между различни третирания, щамове и времеви точки, като позволява интерпретация на пигментните изменения като функция на общата физиологична активност на водорасловата култура. Използването на относителни стойности спрямо сухата маса е утвърдена практика в фитофизиологичните изследвания,

тъй като предоставя независим от влагосъдържанието индикатор за метаболитна активност и пигментна продукция, особено при стресови условия.

Пробите от *Coelastrella* sp. BGV третирани с висока концентация на Cd^{2+} йони при показват най-силно изразен инхибиращ ефект върху съдържанието на хлорофил *a* (0,67%) спрямо контролата (1,25%) **(Фиг. 2a)**. Същевременно, пробите, третирани с мед, не се различават съществено от контролата, докато третирането с Pb, има потискащ ефект. Резултатите, отчетени на 7-ми и 10-ти ден, потвърждават получените тенденции, като запазват същия ход в зависимост от вида и концентрацията на тежкия метал. Подобно инхибиране на хлорофилната биосинтеза наблюдава и в проучването на (Nawaz et al., 2024), който изследва *Scenedesmus quadricauda* установява висока токсичност на Cd в сравнение с Cu в тестваното водорасло.

Третираните с ниски оловни концентрации пробите от *A. africanum* на 3-ти ден не показват значителна разлика с контролния вариант и имат най-високо процентно съдържание на хлорофил *a* **(Фиг. 2b)**. Най-силно потискане в биосинтезата на хлорофил *a* има при третиране със 100 µM кадмий (0,59%), но се наблюдава инхибиране още при третирането с 50µM. Високите оловни концентрации също водят до потискане на хлорофилната биосинтеза. Пробите, обработени с различни концентрации Cu, показват слаб инхибиращ ефект спрямо контролния вариант. На 7-ми ден съдържанието на хлорофил *a* при третиранията с кадмиеви йони е най-ниско в сравнение с контрола, докато най-високо е при пробите 50 µM Cu (1,06%) и 50 µM Pb (1,10%). На 10-ти ден най-високо съдържание на хлорофил *a* се отчита в пробите третирани с ниски концентрации олово и мед, а стойностите респективно 1,04% и 1,59% са близки до експерименталната контрола – 1,71%. Най-ниското съдържание на хлорофил $a \approx 0{,}6\%$ се отчита при пробите, третирани с високи концентрации кадмий и олово.

Намаляването на хлорофил *a* може да се дължи на нарушаване на неговата структура или на инхибиране на биосинтезата на пигмента (Shen et al., 2021).

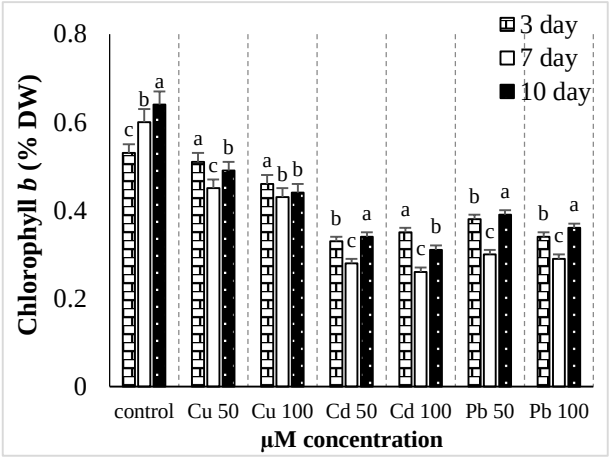
След сравнение с контролния вариант, обобщаваме, че пробите, третирани с мед, стимулират синтеза на хлорофил *a* в *A. africanum*. Malletzidou et al. (2025) изследват влиянието на тежките метали върху цианопрокариота *Arthrospira platensis* и потвърждават настоящите резултати, че ниските концентрации могат да окажат лек стимулиращ ефект върху тестваните микроводорасли, но при високи концентрации на тежък метал в средата, той има инхибиращо пигментната биосинтеза действие.

При пробите на *A. africanum*, третирани с кадмиеви йони, се наблюдава намаление на количеството хлорофил *a*. Интересен е резултатът при третирането с олово, където се наблюдава динамична разлика в съдържанието на хлорофил *a*. При ниските оловни концентрации стойностите са сходни с тези на контролата, което показва, че не се наблюдава значително потискане на пигментния синтез, докато при добавянето на 100μM олово, се отчита висок инхибиторен ефект спрямо контролната група.

3.2. Промени в сдържанието на хлорофил *b*

Данните за съдържанието на хлорофил *b* от ден 3 показват, че в сравнение с контролния вариант най-силен инхибиращ ефект от 0,33% има проби третирани с 50 μM кадмий, а най-слабо 0,51% се повлиява водораслото при добавяне на 50 μM **(Фиг. 3)**.

На ден 7, в сравнение с контролата, данните показват, че най-силно изразен потискащ ефект 0,26% се отчита при третиранията със 100 μM кадмий, а най-високото съдържание на хлорофил b 0,45% отново се отчита при пробите, третирани с 50 μM мед.



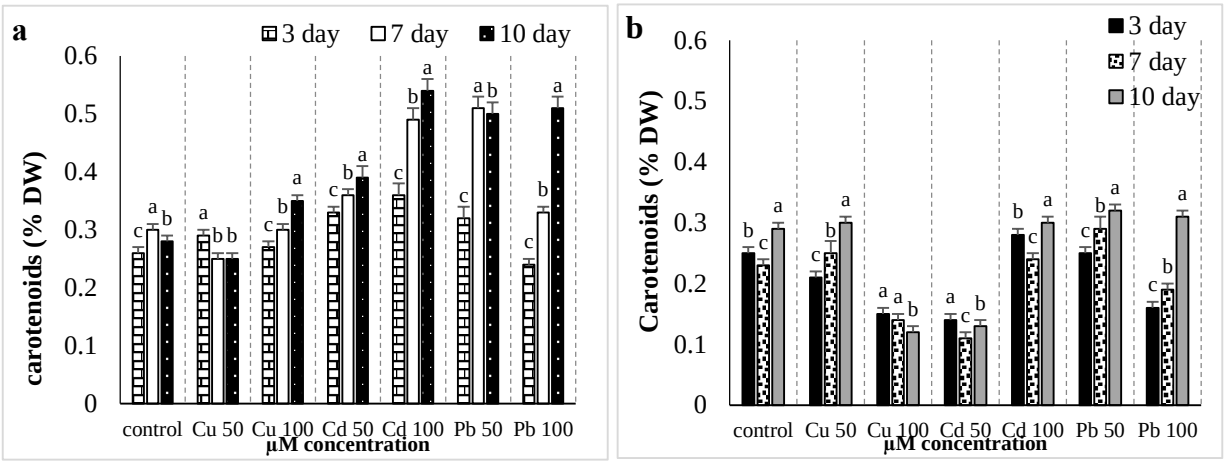
Фигура 3 Влияние на тежки метали върху съдържанието на хлорофил *b* (%DW) в биомасата на *Coelastrella* sp. BGV измерено на 0, 3, 7 и 10 ден след третиране.

Подобни резултати се описват и от Zhou et al. (2012)**,** които изследват отговора на два вида зелени микроводорасли – *C. pyrenoidosa* и *S. obliquus*. Те установяват, че Cu^{2+} йони, оказват лек стимул при прилагането им в ниски концнетрации, но при добавяне на концентрации от 1 mg/L и по-високи потискат биосинтезата на хлорофил *b*. (Hmani, 2024) съобщават, че при изследвания на влиянието на Pb в отговора на *Chlorococcum dorsiventrale* се наблюдава значително намаление на общото съдържание на хлорофили.

3.3. Промени в каротеноидното съдържание

Добавянето на кадмий и олово към хранителната среда води до значително увеличаване на нивото на каротеноидите в *Coelastrella* sp. След подаване на високи дози от двата тежки метала се регистрира увеличение на каротеноидите съответно с 93% и 82% **(Фиг. 4a)**. Изследванията показват, че количеството на каротеноидите в *Coelastrella* sp. BGV се стимулира при третирането с тежки метали, както се очаква.

Отчетените стойности за всички варианти при третиране с тежки метали са значително по-високи от контролния вариант и в трите експериментални дни **(Фиг. 4b)**. Най-високо съдържание на каротеноиди за ден 3 се отчита при Cd100 (0,36%), за ден 7 при Pb50 (0,51%), а за ден 10 най-високото съдържание е при Cd100 (0,54%). Въпреки това, беше наблюдавано значително увеличение на каротеноидите, при *Coelastrella sp. BGV*, което подчертава тяхната антиоксидантна роля при стресови състояния, предизвикани от добавянето на Cd и Pb в средата.



Фигура 4 Влияние на тежки метали върху съдържанието на каротеноиди (%DW) в биомасата на *Coelastrella* sp. BGV **(a)** и *A. africanum* **(b)** измерени на 0, 3, 7 и 10 ден след третиране.

При цианопрокариота е известно, че при екстремни условия на култивиране се наблюдава защитен механизъм на водораслото, който се проявява в усилена синтеза на каротеноиди. В изследване Chaneva et al. (2007) съобщават за повишаване на съдържанието на каротеноиди от около 1% сухо тегло с повишаване на светлинната интензивност. Резултатите от проведените експериментални изследвания потвърждават това твърдение. Данните на ден 3 демонстрират най-ниско процентно съдържание на каротеноиди при пробите, третирани с високи концентрации на мед (0,15%), кадмий

(0,11%) и олово (0,16%). Наблюдава се стимулиране на синтеза на каротеноиди при пробите с Cd100 (0,28%) и Pb50 (0,25%) **(Фиг. 4)**.

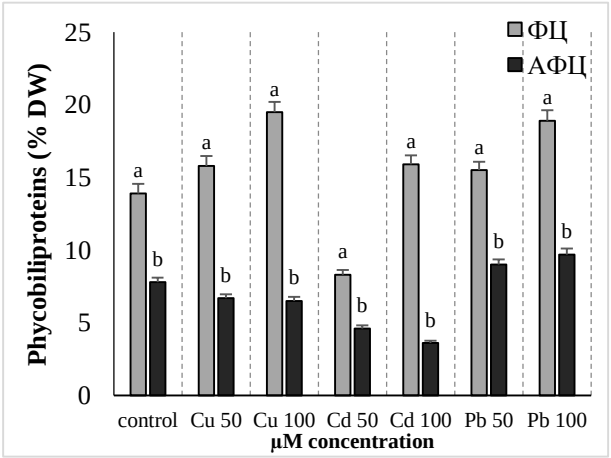
Данните от ден 7 запазват същата тенденция като тези от ден 3. Най-ниското 0,11% съдържание е при пробите с 50μM кадмий, а най-високото 0,29% е при 50 μM олово, спрямо контролния вариант.

Тенденцията се запазва и в резултатите от ден 10, като пробите с добавен 100 μM мед (0,12%) и 50 μM кадмий (0,13%) показват инхибиращ ефект, докато при всички останали проби се отчита повишен синтез на каротеноиди в сравнение с контролата.

Shen et al. (2021) съобщават, че кадмиевите йони са силно токсични за цианопрокариота *Synechocystis sp.*, като инхибират неговия растеж и биосинтеза на пигменти. Освен това авторите отбелязват намалено съдържание на каротеноиди при третиране с Cd, за разлика от нашето проучване, където значителното увеличение на каротеноидите може да се счита за защитна реакция срещу оксидативен стрес, причинен от Cd и особено от Pb.

След анализ на резултатите от ден 3, 7 и 10, може да се обобщи, че най-силно индуцирани стресови условия се създават с добавянето на кадмиеви и оловни йони в моделните системи. Този анализ подкрепя твърдението, че каротеноидите се синтезират усилено при стресови условия като защитен механизъм.

3.4. Промени в съдържанието на фикобилипротеини в *A. africanum*



Фигура 5 Влияние на тежки метали върху съдържанието на фикобилипротеини (%DW) в биомасата на *A. africanum*, измерени на 10 ден след третиране.

Данните за количеството фикобилипротеини — C-PC и APC, са получени на десетия ден от третирането на *A. africanum* с тежки метали**.** Резултатите показват, че най-

ниско съдържание на фикоцианин се отчита при пробите, третирани с 50 μM кадмий (8,3%), докато най-високо съдържание се наблюдава при третирането с 100 μM медни йони (19,5%) **(Фиг. 5)**. При всички останали варианти се наблюдава стимулиране на производството на C-PC спрямо контролния вариант.

По отношение на APC, най-ниският отчетен резултат е при 100 μM кадмий (3,6%), а най-високият резултат е при третирането със 100 μM оловни йони (9,7%). Пробите, третирани с медни йони, показват стойности, близки до контролния вариант (7,8%), като при Cu50 е 6,7%, а при Cu100 – 6,5%.

При изследване на ефекта на Cd върху физиологичните показатели на *Nostoc muscorum* Meg1, (Ahad & Syiem, 2019) установяват, че след седемдневно третиране с кадмиеви йони се наблюдава инхибиране на продукцията на фикобилипротеини — PE и APC, спрямо контролната група.

Arunakumara & Zhang (2019) изследва ефекта на Pb йони върху синьозеленото водорасло *S. platensis* и установява индуцирани промени в структурата на ФС II вследствие на третиране с метални йони. Предполага се, че мултипротеиновият комплекс, локализиран в тилакоидната мембрана е възможната причина за намаленото съдържание на фикобилипротеини при по-висока концентрация на Pb^{2+}. Проучването показва, че при ниски концентрации на оловните йони в средата се наблюдава леко стимулиране на растежа, докато при високи концентрации (100 μg/ml) се наблюдава намаляване на съдържанието на фикобилипротеини.

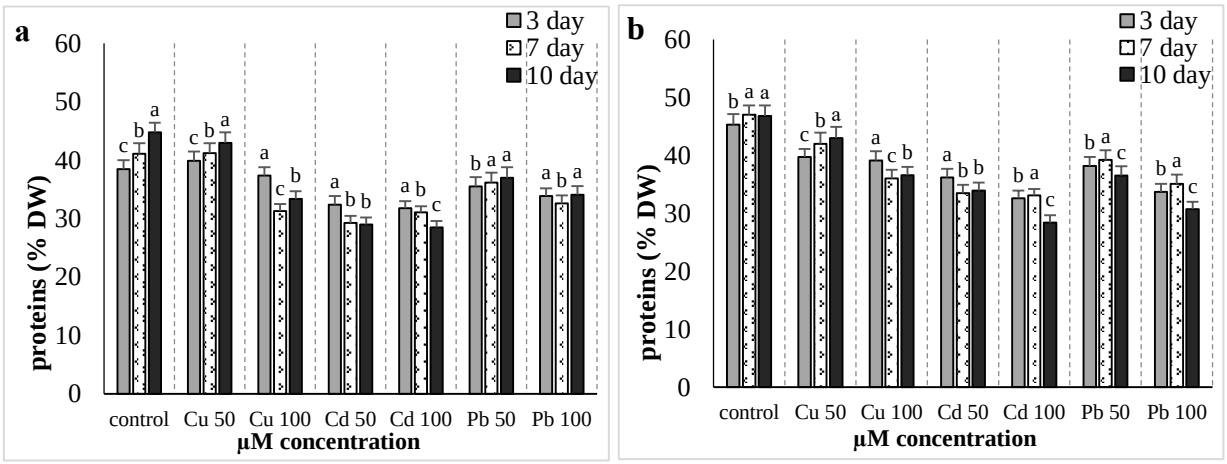
Опити на (Han et al., 2020) показват, че при 24-часово третиране на *Sarcodia suiae* с кадмиеви йони в експериментални системи — на светло и на тъмно, резултатите показват, че съотношенията на цианобактериалните пигменти (C-PC, PE и APC) са по-високи в експерименталната система, отглеждана на светло. Освен това, биосорбцията и биоакумулацията са значително по-високи в същата експериментална система. Това показва, че фотосинтезата на водораслите увеличава биоакумулацията и биоабсорбцията в среда, съдържаща тежки метали.

4. Промени в белтъчния синтез на изследваните щамове

И двете концентрации на Cd предизвикват максимално намаление на протеиновата биосинтеза в *Coelastrella* sp. BGV (~36%). Ефектът на медните йони беше най-слаб, като се наблюдава намаление от около 5% при 50 μM Cu **(Фиг. 6).**

Най-ниското съдържание на протеини в биомасата на *A. africanum* беше измерено на 10-ия ден след обработка с 100 µM Cd и 100 µM Pb. Най-слабо инхибиране на протеиновата биосинтеза беше наблюдавано при третиране с Cu, като намалението е в диапазона от 8% до 22%. Ahad & Syiem (2019) установява, че при третиране на цианобактериалния вид *Nostoc muscorum* Meg1 с кадмиеви йони за 7 дни, белтъчното съдържание се инхибира значително, като намалението е 88% спрямо контрола.

На ден 7 се наблюдава най-високо процентно съдържание на белтък при пробите, третирани с Cu50, като стойността е 41,2%, което е малко по-високо от контролния вариант, при който съдържанието е 41,1%. При пробите, третирани с Cu100, се отчита инхибиращ ефект спрямо контрола, като процентното съдържание на белтък е 31,3%. Пробите с кадмиеви йони показват най-силно изразен инхибиращ ефект, като най-ниско съдържание на белтък се отчита при Cd50 с 29,3% и при Cd100 с 31,1%.



Фигура 6 Влияние на тежки метали върху съдържанието на общ белтък (%DW) в биомасата на *Coelastrella* sp. BGV **(a)** и *A. africanum* **(b)** измерени на 10 ден след третиране.

Резултатите **(Фиг. 6)** от третирането на *A. africanum* с тежки метали на ден 3, 7 и 10 показват, че най-голям инхибиращ ефект спрямо контролата и най-ниско белтъчно съдържание (%) се отчита при пробите, третирани с високи концентрации кадмий и олово. На ден 3 тези стойности са съответно 32,5% и 33,7%. При медните йони се отчита минимален инхибиращ ефект през всички дни. На ден 7 и 10 пробите с кадмий показват най-силен инхибиторен ефект, като на ден 10 съдържанието на белтък при 100 µM кадмий е най-ниско с 28,4%, следвани от 100 µM олово с 30%.

При пробите, третирани с 50 μM олово, не се наблюдава значително изменение спрямо контролния вариант, но при 100 μM олово се забелязва потискане на белтъчния синтез, като процентното съдържание е 32,6%.

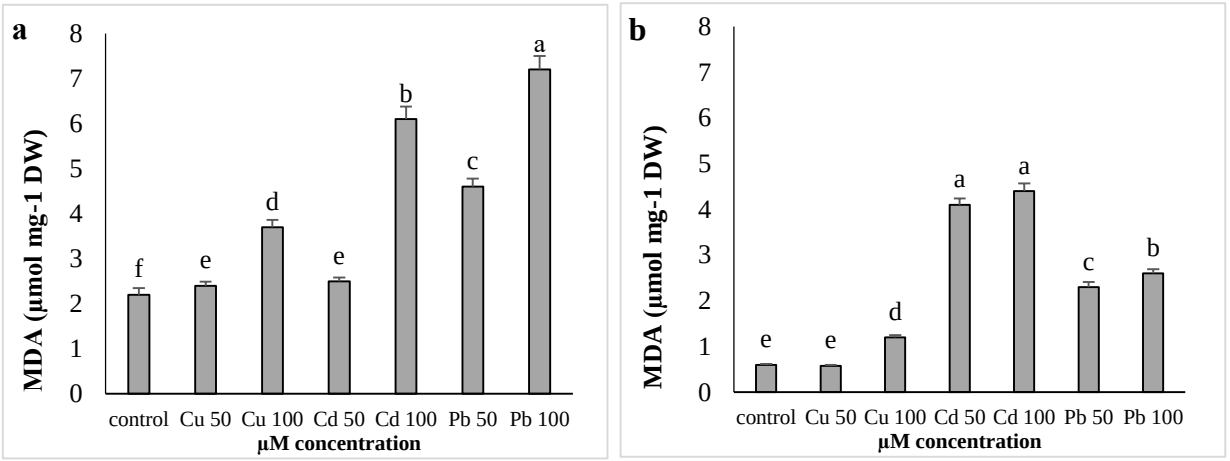
На ден 10 пробите с добавен 50 μM мед, съдържанието на белтък е 43%, което е близко до контролния вариант, докато при пробите със 100 μM мед се наблюдава понижено съдържание от 33,4%. Добавянето на кадмий, оказва значителен инхибиращ ефект, като най-ниско съдържание на белтък се отчита при 100 μM кадмий - 28,5%.

Резултатът за третирания с 50 μM олово е 37,1%, като не се наблюдава значимо различие и при пробите с добавени 100 μM олово - 34,1%.

5. Промени в съдържанието на MDA

Тежките метали могат да увредят мембранните молекули, като нарушат хомеостазата поради увеличено генериране на реактивни кислородни видове (ROS) и повишена липидна пероксидация (Ajayan et al., 2015).

По отношение на *Coelastrella* sp. BGV, щамът показва сходна тенденция на повишение на MDA, макар и в по-малка степен – около трикратно увеличение в отговор на добавянето на Cd и Pb **(Фиг. 7).**



Фигура 7 Влияние на тежки метали върху съдържанието на MDA в биомасата на *Coelastrella* sp. BGV **(a)** и *A. africanum* **(b)** измерени на 10 ден след третиране.

При изследване на промените в нивата на малондиалдехид (MDA), един от най-често използваните маркери за степента на липидна пероксидация в клетките, се установява, че всички изследвани тежки метали водят до увеличение на MDA в тестваните щамове, особено кадмият и оловото **(Фиг. 7)**. Експерименталните третирания в серията медни концентрации, сравнени с контролата, не повишават драстично нивата

на MDA, особено при цианопрокариота, от което предполагаме, че добавянето на мед не индуцира силен стрес в щамовете и не води до значително натрупване на количеството MDA.

Нивото на малондиалдехид в биомасата на *Coelastrella* sp. BGV се увеличава след прилагане на 100 μM Cu и 100 μM Pb, като ефектът е особено изразен при Pb. Стресовата реакция при *A. africanum* е по- различна – най-голямото увеличение на нивата на MDA е измерено след третиране с Cd, последвано от Pb.

Wang et al. (2024) третират *Synechocystis* sp . PCC6803 с Cd, което води до повишаване на съдържанието на MDA в микроводораслите, като откриват, че нивото му нараства от 12,5 nmol/g до 28,4 nmol/g в рамките на първите 20 часа, след което достига 29,74 nmol/g на 48-мия час и остава стабилно до 72 часа. Тези резултати показват, че обработката с Cd предизвиква значително увеличение на MDA, което води до тежко окислително увреждане и дисфункция на клетъчната мембрана в ранните етапи. На по-късен етап, с намаляването на концентрацията на йони, авторите откриват, че се активират различни вътреклетъчни защитни механизми. Тези механизми намаляват нивата на вътреклетъчните свободни радикали, което предотвратява допълнително повишаване на съдържанието на MDA.

С повишаване на концентрацията на мед, експозицията на микроводораслите при този стрес води до окислителни увреждания и липидна пероксидация. В проучването на Zeng et al. (2024), екипът докладва за окислителни увреждания при *C. vulgaris* в серия от концентрации, но със значими резултати и промени в растежните показатели едва след прибавяне на 2 mg/L към средата.

В зелените микроводорасли *S. vacuolatus* и *C. kessleri*, след едноседмично излагане на меден стрес, Sabatini et al. (2009) установяват покачване в нивата на MDA и в двете микроводоралси.

6. Антиоксидантна ензимна защитна система

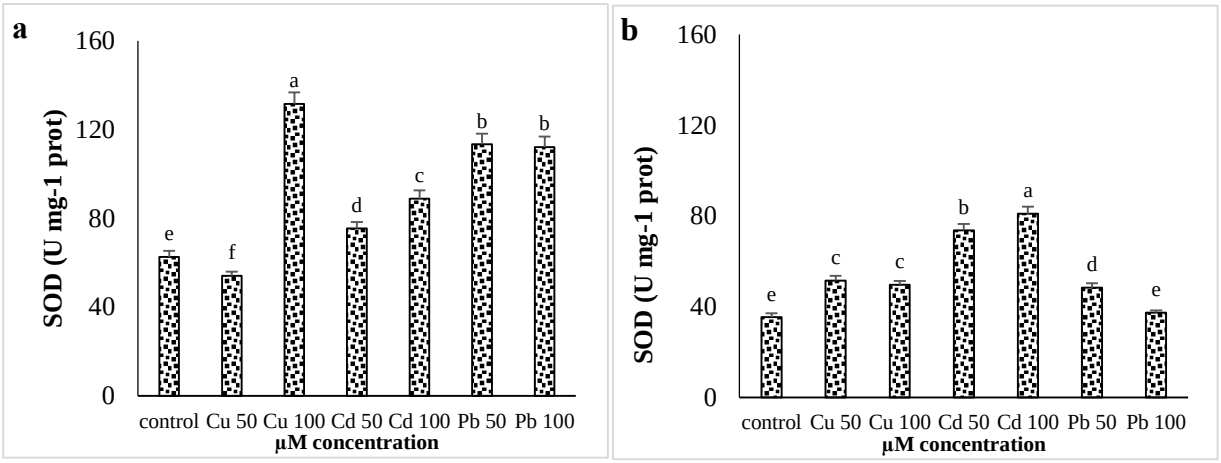
Промените в активността на антиоксидантните ензими – супероксиддисмутаза и каталаза, демонстрират оксидативния стрес, на който са подложени водораслите в моделните системи. Индуцираната висока активност на тези ензими е свързана с повишаване нивата на оксидативен стрес, предизвикан от третирането с тежки метали, докато ниските стойности на ензимните активности сочат към по-слаб оксидативен стрес и по-слабо натрупване на тежки метали. Разлики в активността на

супероксиддисмутазата се наблюдават между двата щама микроводорасли, като най-ниската и най-високата активност се наблюдават при различни третирания с йони на тежки метали.

6.1. Промени в активността на супероксиддисмутаза

Супероксиддисмутазата (SOD) представлява антиоксидантен металоензим, присъстващ в живите организми. Установено е, че тя извлича кислорода и хидроксилните радикали от клетките на микроводораслите. Ензимът катализира диспропорционирането на супероксидни анионни радикали, превръщайки ги в кислород и водороден пероксид, което предпазва клетките от увреждане (Kong et al., 2023).

Активността на SOD в *Coelastrella* sp. показва различни промени – най-високите стойности са регистрирани при третиране с олово (80%–90% увеличение), както и при 100 µM мед. При концентрация от 50 µM ензимната активност остава по-ниска от тази в контролния вариант. SOD в *A. africanum* се увеличава повече от два пъти при двете концентрации на кадмий. По-слабо изразени промени се наблюдават при третиране с мед и олово **(Фиг. 8)**.



Фигура 8 Влияние на третирането с тежки метали върху активността на супероксиддисмутазата (SOD, U mg^{-1}prot) в биомасата на *Coelastrella* sp. BGV **(a)** и *A. africanum* **(b)** след третиране с тежки метали

Анализът на супероксиддисмутазната (SOD) активност при *A. africanum* показва най-ниски стойности при третиране с олово (Pb^{2+}) в концентрация 100 µM, което кореспондира с по-слабо натрупване на метални йони в биомасата. В контраст, пробите, изложени на кадмиеви йони (Cd^{2+}) при двете тествани концентрации (50 и 100 µM),

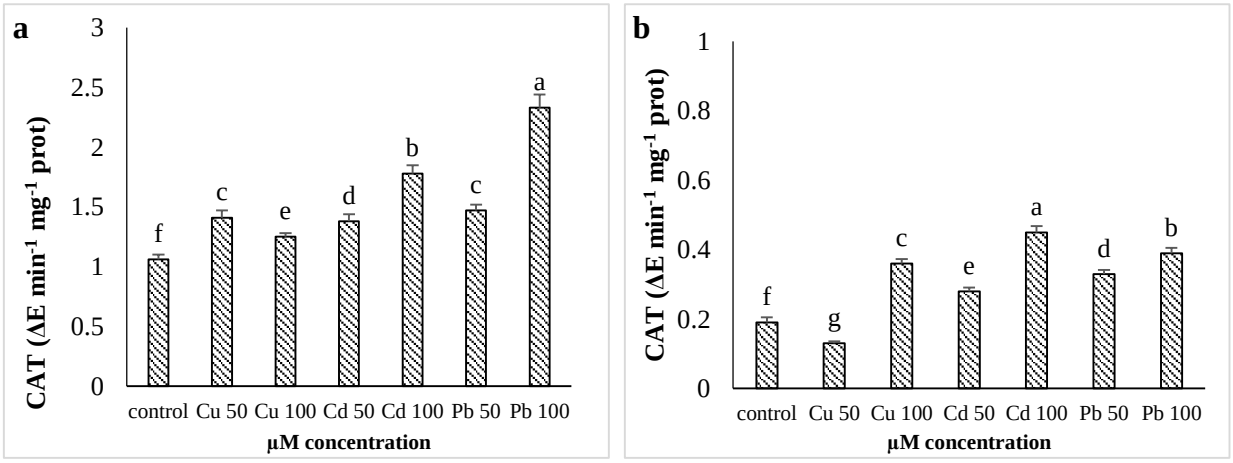
демонстрират значително повишена акумулация на метали, като регистрираните стойности надвишават повече от два пъти тези на контролната група.

Sabatini et al. (2009) докладват за увеличаване на активността на SOD в *S. vacuolatus* с повишаване на медната концентрация добавяна към средата за 7-дневно третиране.

При третиране с кадмий на *Synechocystis* sp. PCC6803, Wang et al. (2024) регистрират първоначално окислителни увреждания от Cd, които водят до увеличаване на синтеза на SOD, но в хода на експеримента при продължително излагане на кадмий, ензимната активност намалява, за което авторите смятат, че може да е постепенната адаптация на микроводорасловите клетки към стреса от тежки метали.

Микроводораслите развиват различни антиоксидантни механизми – както ензимни, така и неензимни, за да намалят окислителните увреждания, причинени от тежки метали (Zhang et al., 2019). Третирането с тежки метали значително повишава активността на SOD и в двата изследвани щама. Активността на SOD в *A. africanum* се увеличава два пъти при стрес, предизвикан от Cd, докато в *Coelastrella sp.* BGV подобно повишение се наблюдава след добавянето на олово.

6.2. Промени в активността на каталаза



Фигура 9 Влияние на третирането с тежки метали върху активността на каталазата (CAT, ΔE min^{-1} mg^{-1}prot) в биомасата на *Coelastrella* sp. BGV **(a)** и *A. africanum* **(b)** след третиране с тежки метали

Активността на каталазата показва различна динамика в сравнение с тази на супероксиддисмутазата. В клетките на в *Coelastrella* sp. BGV се отчитат високи нива на

CAT, като най-значителното повишение е регистрирано при 100 μM кадмий и олово, докато Cu предизвиква по-слабо изразен ефект **(Фиг. 9)**. Подобни резултати са отчетени и за активността на CAT в *A. africanum* при 100 μM кадмий и олово, като стойностите са два пъти по-високи от тези в контролния вариант. Медните йони имат по-слаб ефект върху ензимната активност на CAT.

Cd и Pb също водят до значително увеличение на CAT активността, но тези промени не корелират напълно с нивата на SOD и MDA. При *Coelastrella sp.* най-голямото повишение на CAT се регистрира след добавянето на Pb в средата, докато при *A. africanum* Pb и Cd предизвикват сходно увеличение на активността.

Очевидно е, че ензимната антиоксидантна защита на *A. africanum* като част от антистресовия отговор не е достатъчна, за да преодолее токсичността на тежките метали. Това се проявява чрез силно инхибиране на растежа на щама. Вероятно и при двата щама елиминирането на ROS включва допълнителни защитни механизми извън антиоксидантните ензими.

7. Акумулиране на Cu, Cd и Pb в биомасата на *Coelastrella* sp. BGV и *A. africanum*.

Резултатите показват, че и двата изследвани щама натрупват значителни количества тежки метали, добавени към средата. Клетките на водораслите демострират най-висока склонност към абсорбиране на Pb йони, следвани от Cd и Cu. *Coelastrella* sp. BGV проявява особено висок капацитет за натрупване на тежки метали в биомасата в сравнение с цианопрокариота *A. africanum* **(Табл. 1)**.

Резултатите относно физиологичните и биохимичните промени в *A. africanum* и *Coelastrella sp.* предполагат, че медта влияе върху метаболитните процеси в клетките на водораслите чрез механизъм, различен от този на оловото и кадмия. Това заключение се подкрепя от начина, по който двата щама натрупват тежки метали от хранителната среда. И двете микроводорасли показват висок капацитет за абсорбиране на метални йони, особено Pb, който се натрупва в биомасата в значително по-високи концентрации от Cu и Cd. Степента на поемане на тежки метали следва реда: Pb > Cd > Cu **(Табл. 1)**.

Coelastrella sp., BGV, демонстрира значително по-висока способност за абсорбция на метални йони, като този процес не повлиява толкова силно растежа ѝ, колкото при *A. africanum*.

Таблица 1 Промени в акумулирането на Cu, Cd и Pb (mg kg^{-1} DW) в биомасата на *Coelastrella* sp. BGV и *A. africanum,* 10-ти ден на третиране

вариант	**Cu (mg/kg)**	**Cd (mg/kg)**	**Pb (mg/kg)**
	***Coelastrella* sp. BGV**		
контрола	66.7	69.5	56.0
Cu 100 µM	1285.2	12.0	99.0
Cd 100 µM	59.5	5069.9	33.8
Pb 100 µM	75.5	29.5	12230.2
	A. africanum		
контрола	49.1	129.3	36.1
Cu 100 µM	349.8	106.8	16.9
Cd 100 µM	38.8	3258.3	13.7
Pb 100 µM	37.3	145.7	6431.3

В резултатите на Goswami et al. (2015) и Marinova et al. (2018), получени при третиране на *Sc. incrassatulus* с Cu, Cd и Pb, са сходни с тези изследвания. Едноклетъчните зелени водорасли са често използвани за моделни изследвания на акумулацията на тежки метали, тъй като тези видове се срещат широко в замърсените водоеми.

Awasthi & Rai (2005) препоръчват *S. quadricauda* за елиминиране на токсични концентрации на Ni, Zn и Cd. Някои видове от род Scenedesmus могат да свързват медни йони екстрацелуларно, а оловните йони - както извънклетъчно, така и вътреклетъчно, в полифосфатни телца (Ajayan et al., 2015). Напоследък се счита, че микроводораслите, особено зелените, имат потенциал за ремедиация на замърсени водоеми с тежки метали и този метод се смята за икономически ефективен (Vanerkar, 2015). Въпреки това, въпросът за детоксикацията на тежките метали, натрупани във водорасловата биомаса, остава нерешен.

Получените резултати подкрепят възможността микроводораслите да бъдат ефективни за фикоремедиация. Разликите в техния капацитет за усвояване показват, че определени йони на тежки метали могат да взаимодействат специфично с конкретни щамове водорасли. Cd и Pb се оказват най-токсични за растежа и биосинтеза на пигмента, като провокират най-силния антиоксидантен отговор и повишават нивата на MDA и

активността на антиоксидантните ензими и в двата изследвани щама. В изследването срещу Cu, Cd и Pb, цианопрокариотът *A. africanum* е по-чувствителен към стреса от тежки метали от *Coelastrella* sp. BGV, който показва по-висок потенциал за абсорбция. Смятаме, че след изследването на потенциала на двата щама в кокултивационни системи с висше растение за фикоремедиация и ефективно преживяване на стресови условия причинени от тежки метали ще допринесем за разширяване на знанията за механизмите на стрес от тежки метали в микроводораслите и тяхното бъдещо приложение в фиторемедиацията.

V. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

ЧАСТ II: ФИКОРЕМЕДИАЦИОНЕН ОТГОВОР НА МИКРОВОДОРАСЛИ КЪМ ZN В СУПРАОПТИМАЛНИ КОНЦЕНТРАЦИИ

Цинкът (Zn) е микроелемент от съществено значение за редица биохимични и физиологични процеси, включително фотосинтеза, стабилизиране на мембрани, ензимна активност и синтез на хлорофил (Anjum et al., 2015). Като кофактор в карбоанхидразата, той участва в регулацията на въглеродния метаболизъм и водния баланс. Въпреки своята незаменима роля, при повишени концентрации цинкът проявява изразена фитотоксичност, водеща до структурни и функционални увреждания в клетъчните компоненти, включително нарушена фотосинтетична ефективност, инхибиране на ензимни системи и намалена биомаса (Broadley et al., 2007; Zhou et al., 2022). Прекомерното натрупване на Zn може също така да наруши баланса на други основни минерални елементи, да модифицира микробното разнообразие в средата и да предизвика оксидативен стрес (Milieu et al., 2010).

На фона на индустриализацията и увеличеното използване на Zn в селското стопанство и технологиите, натрупването му във водни и почвени среди се превръща във все по-сериозен екологичен проблем. В същото време именно тази двойствена природа на Zn — като жизненоважен елемент и като потенциален токсикант — го прави обект на интензивни научни изследвания, насочени към оценка на механизмите на токсичност и разработване на стратегии за ремедиация (Long et al., 2003; Audet & Charest, 2006; Kaur & Garg, 2021).

В тази връзка, микроводораслите се утвърждават като обещаващ инструмент за фикоремедиация на Zn-съдържащи отпадъчни води, тъй като не само демонстрират устойчивост към метала, но и акумулират Zn^{2+} в клетъчната си биомаса, като същевременно произвеждат ценни съединения с приложна стойност (Khudsar et al., 2004). Интегрирането им в съвместни системи с висши растения създава възможност за биоинженерно управление на средата, при което се наблюдава подобрено усвояване на хранителни вещества, редуциране на токсичността и повишаване на продуктивността на растенията (Vaillant et al., 2005).

Зеленият грах (*P. sativum* L. *cv.* RAN1), представител на семейство *Fabaceae*, е основна хранителна култура с висока биологична стойност — богат източник на протеини (20–22%), есенциални аминокиселини, витамини и минерали, включително Zn,

Fe, Cu и Ca (Kumar et al., 2015; El-Agawany & Kaamoush, 2022; Mathimani et al., 2023). Неговата способност да се развива в различни агроекологични условия, включително в хидропонни среди, го прави подходящ модел за изследване на стресовия отговор при експозиция на тежки метали, и в частност Zn^{2+}.

Настоящото изследване не започва с ниски концентрации на Zn, тъй като предварителните експерименти с водорасловите щамове показаха отчетлива толерантност и минимален стресов отговор дори при концентрации до 100 μmol. Поради тази причина втората част от дисертацията директно се фокусира върху сравнително високи концентрации на Zn (2, 5, 10 и 15 mmol), за да се анализират границите на физиологичната адаптация и възможностите за фикоремедиация в по-реалистичен индустриален контекст.

В тази глава се представят резултати от три паралелни моделни хидропонни системи за съвместно култивиране на *P. sativum* с два еволюционно различни микроводораслови щама – представител на зелените микроводорасли (*Coelastrella* sp. BGV) и на цианопрокариотите (*A. africanum*). Системите са подложени на градиент от Zn^{2+} стрес и анализът обхваща:

- физиологичните показатели на водораслите (темп на растеж, pH, съдържание на разтворен кислород),
- фотосинтетичната активност на граха,
- биоакумулацията на Zn^{2+} в различни растителни и водораслови органи.

Този мултидисциплинарен подход има за цел да разкрие взаимодействието между видове с различна биологична организация при тежкометален стрес и да оцени ефективността на комплексните биосистеми като екологично устойчиви решения за редуциране на замърсявания с цинк.

Таблица 2 Моделни експериментални системи за третиране с Zn

№	Моделна система I	Моделна система II	Моделна система III
1	**Knop medium + *P. sativum* L. - control**	***Coelastrella* sp. BGV + *P. sativum* L. – control**	***A. africanum* + *P. sativum* L. – control**
2	**Knop medium + *P. sativum* L. + 2 mM $ZnSO_4$**	***Coelastrella* sp. BGV + *P. sativum* L. + 2 mM $ZnSO_4$**	***A. africanum* + *P. sativum* L. + 2 mM $ZnSO_4$**
3	**Knop medium + *P. sativum* L. + 5 mM $ZnSO_4$**	***Coelastrella* sp. BGV + *P. sativum* L. + 5 mM $ZnSO_4$**	***A. africanum* + *P. sativum* L. + 5 mM $ZnSO_4$**
4	**Knop medium + *P. sativum* L. + 10 mM $ZnSO_4$**	***Coelastrella* sp. BGV + *P. sativum* L. + 10 mM $ZnSO_4$**	***A. africanum* + *P. sativum* L. + 10 mM $ZnSO_4$**
5	**Knop medium + *P. sativum* L. + 15 mM $ZnSO_4$**	***Coelastrella* sp. BGV + *P. sativum* L. + 15 mM $ZnSO_4$**	***A. africanum* + *P. sativum* L. + 15 mM $ZnSO_4$**

1. Съвместно култивиране на микроводорасли/грахово растение при третиране с Zn

Ефектът на Zn **(Фиг. 10)** се наблюдава в три експериментални системи, в които граховите растения се култивират с помощта на:

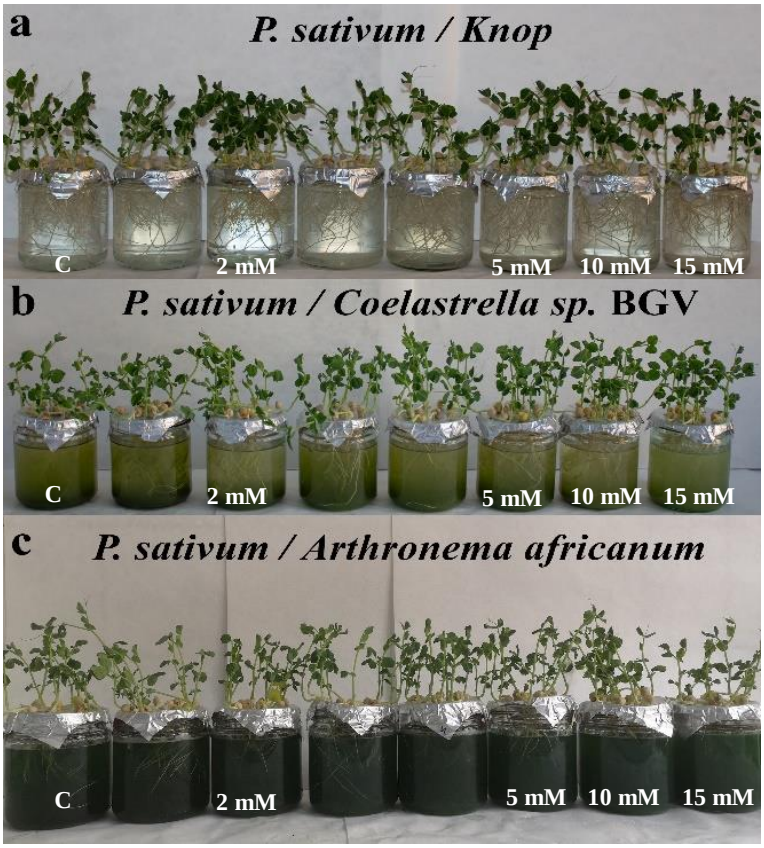
a) контролен разтвор на Knop;

b) *Coelastrella* sp. BGV;

c) *Arthronema africanum*.

Суспензиите от водорасли се поддържат във фаза на експоненциален растеж.

Експериментът е с продължителност 7 дни, като анализите се извършват на дни 0, 3, 5 и 7. Настоящите резултати показват скрининг на серия от концентрации на $ZnSO_4$ (2 до 15 mM) в кокултивационни системи, сравнени с нетретирана контрола. Предварително е направен скрининг на стресовия отговор на тестваните микроводорасли в обширен диапазон от концентрации на $ZnSO_4$. Подбраните и представени концентрациите показват значителни разлики в резултатите.



Фигура 10 Експериментални системи* за съвместно култивиране при третиране с $ZnSO_4$ на ден 3. **(a)** *P. sativum* в контролна среда на Knop. **(b)** *P. sativum* с *Coelastrella* sp. BGV. **(c)** *P. sativum* с *A. africanum*. **На изображението са показани всички приложени концентрации на Zn^{2+} (0–20 mM); в резултатите са представени само тези нива, при които се наблюдават отчетливи физиологични разлики и значими биометрични ефекти.*

1.1. Нива на pH в хранителни разтвори

Нивата на pH варират значително между трите експериментални системи. В контролната система с разтвор на Knop стойностите на pH остават постоянни по време на експеримента, поддържайки ниво от ≈6. В системата, третирана със зелените водорасли *Coelastrella* sp. BGV, pH се повишава до 9 на дни 3, 5 и 7. Въпреки това се наблюдава понижаване на pH при концентрации на $ZnSO_4$ от 10 и 15 mM до края на експеримента, макар че тези стойности все още са по-високи, отколкото в контролата. В присъствието на *A. africanum* pH се повишава с 22% в нетретирания контролен вариант.

Таблица 3 Нива на pH в експериментални системи на *P. sativum*, изложени на серия от Zn концентрации. Пробите бяха анализирани на 0, 3, 5 и 7 дни съвместно култивиране.

pH	***P. sativum*/ Knop**				***P. sativum*/ *Coelastrella* sp. BGV**				***P. sativum*/ *Arthronema africanum***			
$ZnSO_4$	**0d**	**3d**	**5d**	**7d**	**0d**	**3d**	**5d**	**7d**	**0d**	**3d**	**5d**	**7d**
0 mM	6,02	6,02	6,04	6,05	8,01	9,05	9,02	9,00	7,03	8,50	9,00	9,04
2 mM	6,02	6,00	6,00	6,00	8,01	9,00	9,02	9,06	7,03	7,30	7,38	7,46
5 mM	6,02	6,03	6,09	6,08	8,01	9,00	9,00	8,98	7,03	7,02	6,50	6,34
10 mM	6,02	6,00	6,02	6,00	8,01	8,78	7,63	7,11	7,03	6,80	6,23	6,00
15 mM	6,02	6,00	6,05	6,00	8,01	8,26	7,41	6,56	7,03	6,05	5,98	5,90

Отчетено е също леко увеличение при 2 mM $ZnSO_4$. В останалите варианти pH намалява в хода на експеримента, достигайки контролните нива **(Табл. 3)**.

pH на културалната среда оказва значително влияние върху разтворимостта на металните йони и тяхното взаимодействие с функционалните групи на биомасата, което го прави ключов фактор в процесите на биосорбция (King et al., 2007). Оптималното pH за *Lyngbya taylorii* с висок капацитет за поглъщане на тежки метали, като Pb, Cd и Zn, е между pH 3 и 7 (Klimmek et al., 2001). По-високите нива на pH в системата с *Coelastrella sp. BGV* в сравнение с контролните проби вероятно подобряват сорбционния капацитет за Zn^{2+}, като намаляват конкуренцията между протоните и металните йони за свързващите места (Gaur & Dhankhar, 2009)**.**

Данните показват, че и двата микроводорасловидни щама акумулират цинк от култивационната среда, като *A. africanum* проявява по-висок капацитет за абсорбция в сравнение с *Coelastrella* sp. BGV, независимо от отчетените по-ниски стойности на pH.

Този резултат предполага наличие на видовоспецифични адаптации, свързани с повърхностния заряд и структурните характеристики на клетъчната стена. Известно е, че ефективността на адсорбцията при микроводораслите е силно зависима от pH на средата, тъй като то повлиява йонното състояние на функционалните групи, участващи в свързването на металните йони.Положително заредените водородни йони могат да се конкурират с металните йони за свързване с лигандите на клетъчната стена (Kaewsarn, 2002). Увеличаването на pH намалява концентрацията на протони, което от своя страна понижава конкуренцията между протоните и йоните на тежките метали. Това води до увеличаване на сорбционния капацитет за Zn^{2+} йони (Gaur & Dhankhar, 2009).

1.2. Динамика на разтворения кислород в кокултивационните системи под влияние на Zn стрес

Високите концентрации на Zn (10-15 mM) причиняват общо намаляване на нивата на кислород, достигайки 5 до 6 mg/L на ден 7 **(Табл. 4)**. Обратно, при по-ниски концентрации на Zn (2 и 5 mM), нивата на кислород се повишават в системите на микроводораслите по време на ко -култивиране, достигайки 7 до 8 mg/L. При тези по-ниски концентрации на Zn, *A. africanum* произвежда повече кислород от *Coelastrella* sp. BGV.

Таблица 4 Съдържание на кислород (mg/L) в експериментални системи на *P. sativum*, изложени на серия от концентрации на Zn. Пробите бяха анализирани на 0, 3, 5 и 7 дни съвместно култивиране.

O_2	***P. sativum*/ Knop**				***P. sativum*/ *Coelastrella* sp. BGV**				***P. sativum*/ *A. africanum***			
$ZnSO_4$	**0d**	**3d**	**5d**	**7d**	**0d**	**3d**	**5d**	**7d**	**0d**	**3d**	**5d**	**7d**
0 mM	6,47	6,45	6,38	6,30	6,43	7,02	7,78	8,70	6,58	6,67	6,70	7,50
2 mM	6,47	6,45	6,37	6,30	6,43	6,58	6,65	7,44	6,58	7,19	7,59	7,89
5 mM	6,47	6,30	6,25	6,20	6,43	6,45	6,48	6,50	6,58	6,85	7,06	7,31
10 mM	6,47	6,26	6,18	6,09	6,43	6,31	6,23	6,10	6,58	6,41	6,11	6,00
15 mM	6,47	6,43	6,25	6,02	6,43	6,34	6,22	6,00	6,58	6,11	5,37	5,22

2. Ефект на Zn върху параметрите на растеж на микроводорасли и висши растения

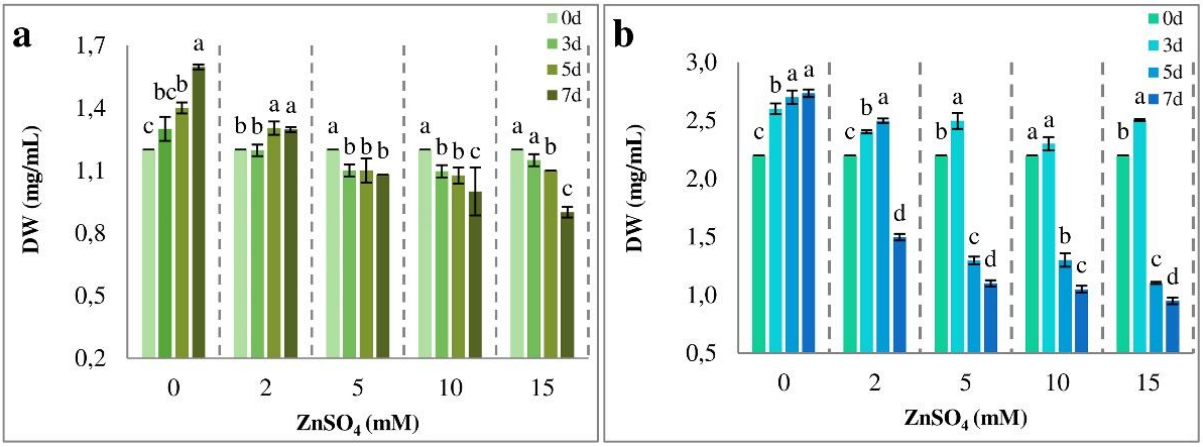
2.1. Ефект на Zn токсичност върху растежа на водораслите

Растежът на щамове водорасли след третиране със Zn^{2+}, добавени в културалния разтвор като $ZnSO_4$, се определя чрез измерване на промените в натрупването на биомаса.

Експерименталните резултати показват, че третирането на двата щама водорасли с избраните концентрации на $ZnSO_4$ не повлиява сериозно растежа на ден 3, което предполага ниво на резистентност към въздействието на Zn. Въпреки това, значително намаляване на растежа се наблюдава и при двата щама при концентрации на $ZnSO_4$ от 5, 10 и 15 mM $ZnSO_4$ на дни 5 и 7. Интересното е, че зеленото водорасло *Coelastrella* sp. BGV показва по-голяма толерантност в сравнение с *A. africanum*.

Стимулирането на растежа на *Coelastrella* sp. BGV е наблюдавано при 0 и 2 mM $ZnSO_4$, особено изразена на 5 и 7 ден от началото на третирането. Наличието на $ZnSO_4$ предизвиква инхибиторен ефект върху растежа на *Coelastrella* sp. BGV при 5 mM (**Фиг. 11a**). При по-високи $ZnSO_4$ концентрации, инхибиторният ефект е по-очевиден. По-специално, при 15 mM $ZnSO_4$ на 7-ия ден е регистрирано силно потискане на растежа от ≈25% в сравнение с контролата.

Растежът на *A. africanum* се повлиява от 2 mM $ZnSO_4$ на ден 3 **(Фиг. 11b)**. Силно инхибиране на растежа се наблюдава при по-високи концентрации след 5 и 7 дни на култивиране. При 5 и 10 mM $ZnSO_4$, биомасата намалява съответно с 52% и 54%, в сравнение с контролата на ден 0. При 15 mM $ZnSO_4$ на ден 7 е записано максимално намаляване на биомасата от 58%.



Фигура 11 Ефект от обработката с Zn върху растежа на микроводораслите.Пробите бяха анализирани на 0, 3, 5 и 7 дни. Данните са представени като средно ± SE. Еднопосочна ANOVA (с post hoc статистически тест на Fisher) беше използвана за оценка на разликите в сухото тегло (DW) през периода на култивиране за всяко третиране. Различните букви показват статистически значими разлики при $p < 0,05$. *Coelastrella* sp. BGV. **(a)** и *A. africanum* **(b)**.

Забавеното усвояване на тежките метали, съпроводено с удължен латентен период на растеж при микроводораслите, предполага наличие на метаболитни адаптации, насочени към минимизиране на токсичното въздействие. Този отговор е показателен за устойчивостта на микроводорасловите щамове и подкрепя тяхната приложимост в условия на интензивно метално натоварване, каквито са характерни за фикоремедиационните стратегии.

Паралелно с оксидативния стрес, индуциран от метална експозиция, при двата щама се наблюдава повишена липидна акумулация — процес, разглеждан като защитен механизъм за редуциране на токсичността чрез включване на йони в липидни везикули или мембранни компоненти (Khudsar et al., 2004; Suresh Kumar et al., 2015; Zhou et al., 2022; Song et al., 2024). Тази липидна реакция може да представлява ключов компонент от клетъчния адаптационен отговор към тежкометален стрес.

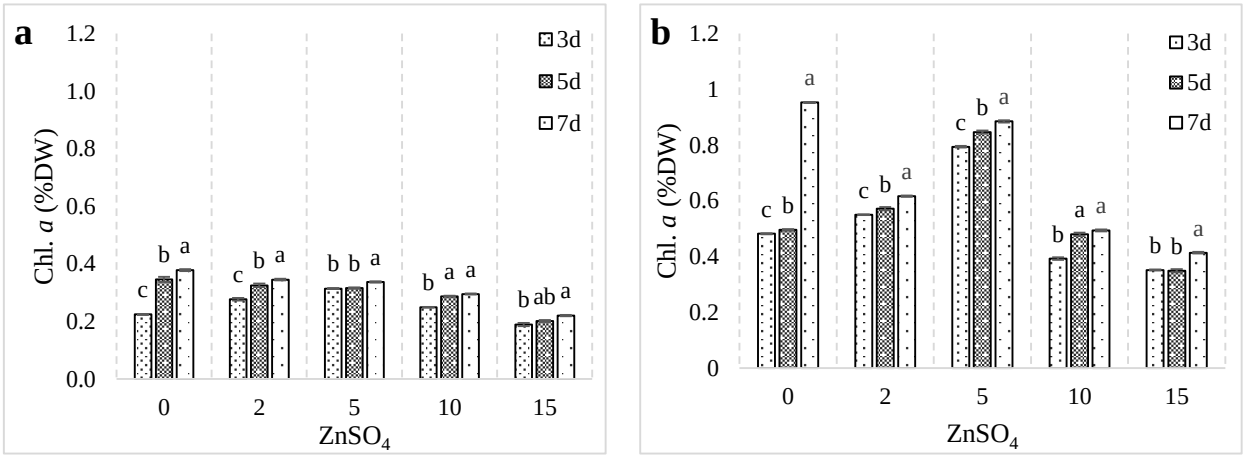
3. Ефект върху пигментното съдържание на водораслите и граха

3.1. Ефект на Zn стреса върху пигментното съдържание на водораслите

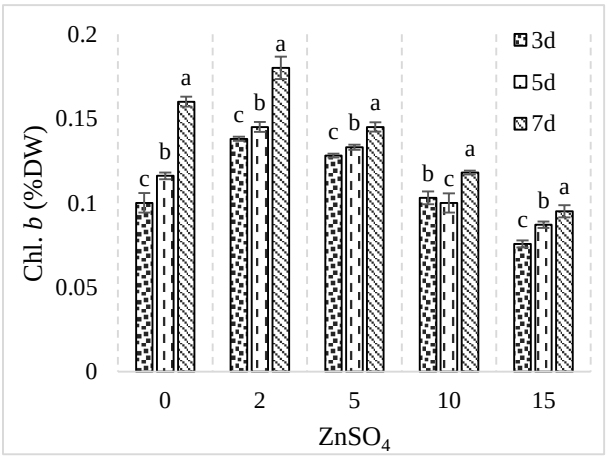
3.1.1. Промени в хлорофилното съдържание

Съдържанието на хлорофил a е проследено на 3, 5 и 7 ден от култивирането в двете експериментални системи. Данните от **Фиг. 12** показват по-високи стойности на хлорофил a при цианопрокариотния щам *A. africanum* в сравнение със зеленото микроводорасло *Coelastrella* sp. BGV. При третиране с 2 и 5 mM Zn се отчита повишаване на хлорофилното съдържание при *A. africanum*, което предполага функционално запазване на фотосинтетичния апарат в условия на умерен цинков стрес. При останалите концентрации съдържанието на хлорофил a остава в близки граници до контролните стойности и при двата щама.

Междувидовият сравнителен анализ показва стабилно по-ниски нива на хлорофил *a* при *Coelastrella* sp. BGV в сравнение с *A. africanum*, дори при най-високата тествана концентрация на $ZnSO_4$ (15 mM). Анализът на съотношението хлорофил *a*: хлорофил *b* (приблизително 2:1) при *Coelastrella* sp. BGV **(Фиг. 13)** показва също, че съдържанието на хлорофил *b* следва сходна тенденция на редукция с повишаването на концентрацията на Zn, което отразява натрупване на физиологичен стрес.



Фигура 12 Влияние на тежките метали (Zn) върху съдържанието на хлорофил *a* (%DW) в *Coelastrella* sp. BGV **(a)** и *A. africanum* **(b)**, измерени на 3-тия, 5-ия и 7-ия ден след третирането (добавен Zn в концентрации 2,5,10,15 mM и контрола).



.

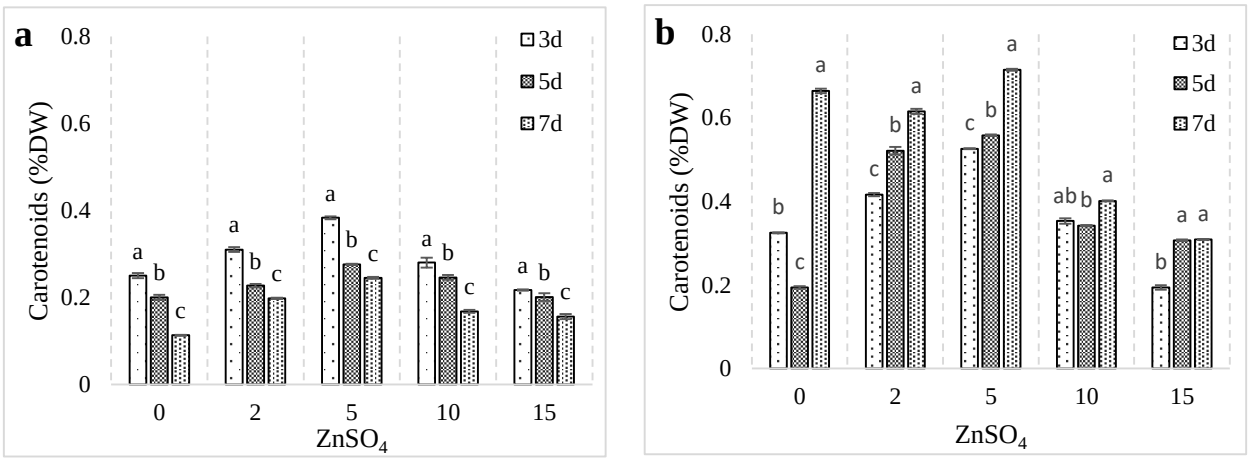
Фигура 13 Влияние на тежките метали (Zn) върху съдържанието на хлорофил *b* (% DW) в *Coelastrella* sp. BGV, измерен на 3-ия, 5-ия и 7-ия ден след третирането (добавен Zn в концентрации 2,5, 10, 15 mM и контрола).

В проучване на (Tan et al., 2024), който изследва Zn стресов отговор в зеленото микроводорасло *C. sorokiniana*, се съобщава, че растежът на водораслото е тясно свързан с фотосинтетичната ефективност, която е зависима от съдържанието на фотосинтетични пигменти. Авторът установява, че с нарастване на концентрацията Zn се отчита намаляване на фотосинтетичните пигменти. В нашето изследване са проследени динамичните промени в количеството на хлорофила. Резултатите показват стимулиращ ефект при прилагане на 2 и 5 мМ Zn, който е по-силно изразен при *A. africanum* в сравнение с *Coelastrella* sp. BGV

3.1.2. Промени в каротеноидното съдържание

Каротеноидите и техните производни съединения се свързват с липопротеините и играят ключова роля като антиоксиданти по време на фотосинтезата. Те осигуряват защита срещу липидна пероксидация, оксидативно увреждане на ДНК и протеини, както и имат потенциална роля в превенцията на рака (Lordan et al., 2011). Разнообразните функции на каротеноидите включват пренасяне на светлинна енергия към хлорофилите и защита на фотосинтетичнния апарат чрез обезвреждане на реактивни кислородни видове (ROS) и предотвратяване на тяхното образуване (Huang et al., 2017). Микроводораслите и цианопрокариотите като фотосинтезиращи организми, съдържат в клетките си α- и β-каротини, акстасантин и др. Общото каротеноидно съдържание в микроводораслите рядко надвишава 10% и те присъстват като смес от каротеноиди. В *Porphyridium cruentum*, (Rebolloso Fuentes, 2000) откриват 1,0 mg g^{-1} биомаса, докато Santiago-Morales et al. съобщават за 4,6 mg g^{-1} биомаса за β-каротин в *T. suecica* (López-Hernández et al., 2020; Santiago-Morales et al., 2018).

Промените в каротеноидното съдържание при *A. africanum* показват по-високи стойности в сравнение с тази при *Coelastrella* sp. BGV **(Фиг. 14)**. В динамиката на експеримента се отчита стимулиране на производството на каротеноиди и при двата щама третирани с 2 и 5 мМ Zn. Забелязва се тенденция на понижаване на каротеноидното съдържание при високите Zn концентрации и при двата експериментални обекта. Най-високи нива се регистрират при *A. africanum* в края на експерименталното култивиране (7 ден) при всички Zn концентрации.

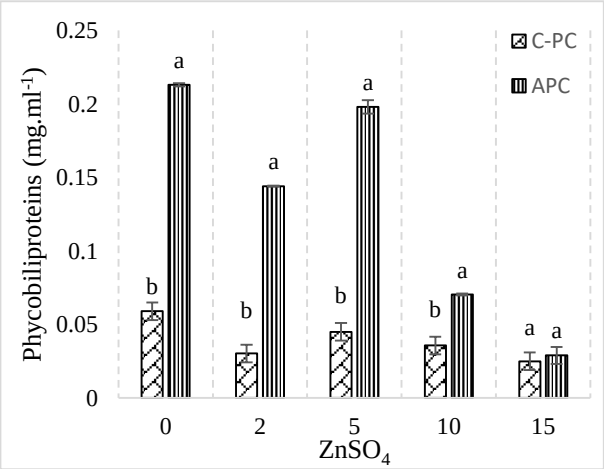


Фигура 14 Влияние на тежките метали (Zn) върху съдържанието на каротеноиди (%DW) в *Coelastrella* sp. BGV **(a)** и *A. africanum* **(b)**, измерени на 3-ия, 5-ия и 7-ия ден след третирането (добавен Zn в концентрации 2,5,10,15 mM и контрола).

Получените резултати са в съответствие с проучването на (Zhou et al., 2018), които съобщават, че ниските концентрации на Zn не потискат биосинтезата на пигменти, особено на каротеноиди. Das et al. (2023), които изследват зеленото микроводорасло *Scenedesmus obliquus*, установяват, че високите Zn концентрации водят до значително намаляване на хлорофилната и каротеноидна синтеза, което е индикация за увреждане на фотосинтетичния апарат. Нашите резултати за нивата на каротеноидите корелират с данните на Zhou et al. (2018) и Das et al. (2023) като при ниските концентрации на Zn се наблюдава стимулиране на тяхната синтеза, вероятно като защитен механизъм срещу оксидативен стрес. Проучването на Chaneva et al. (2009) върху цианопрокариота *Plektonema boryanum,* които установяват натрупване на каротеноиди като физиологичен отговор на метална токсичност, съответстват на нашите наблюдения при двата изследвани водораслови вида.

3.1.3. Съдържание на фикобилини при *A. africanum*

Измерено е съдържанието на фикобилипротеините - специфични пигменти за цианопрокариотите на 7 ден от култивирането. Наблюдава се положително влияние на Zn върху съдържанието на алофикоцианин (APC) и ц-фикоцианин (*C*-PC). Най-силен ефект се регистрира при третиране с 5мМ Zn като нивата на APC синтез почти достигат контролните стойности **(Фиг. 15)**. Отчита се вариране в отделянето на *C*-PC при използваните концентрации Zn като най-високо количество от този пигмент е измерено при 5мМ, но не достига контролните нива. Най-ниско съдържание на *C*-PC е измерено при третиранията с 2 и 15 mM Zn.



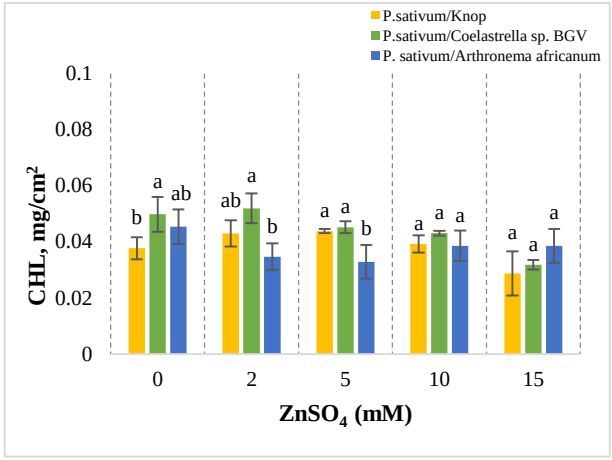
Фигура 15 Влияние на тежките метали (Zn) върху съдържанието на каротеноиди (%DW) в *Coelastrella* sp. BGV **(a)** и *A. africanum* **(b)**, измерени на 3-ия, 5-ия и 7-ия ден след третирането (добавен Zn в концентрации 2,5,10,15 mM и контрола).

Резултатите за промените в нивата на фикобилипротеините в цианопрокариота, вероятно са част от адаптивния отговор на *A. africanum* към приложения цинков стрес. Намалените нива на фикобилипротеини при третиране с Zn^{2+} йони, служи като индикатор за увреждане на фотосинтетичния апарат и се явява като показател за степента на стрес, предизвикан от цинка. Rudi et al. (2024) изследват адаптивния потенциал на *Arthrospira platensis* към цинков стрес, като фикобилините действат като ключов елемент в този процес. Тяхното проучване показва, че с повишаване на концентрацията на Zn, синтезът на фикобилипротеините намалява, което се потвърждава в нашите резултати.

3.2. Ефект на Zn стрес върху пигменти на граха

3.2.1. Общо съдържание на хлорофили

Общото съдържание на хлорофил в листата на грах във всички варианти на трите експериментални системи не се повлиява значително след третиране с $ZnSO_4$ **(Фиг. 16)**. Интересно е, че при по-ниски дози Zn се наблюдава леко увеличение на съдържанието на хлорофил във варианти на *P. sativum*, култивирани съвместно с *Coelastrella* sp. BGV, в сравнение с тези, култивирани съвместно с *A. africanum*. Най-видимо понижение на нивата на хлорофил е регистрирано в растения, третирани с по-ниски дози Zn (2 и 5 mM $ZnSO_4$) в системата P. *sativum/A. africanum*, което показва 25% намаление в сравнение с контролните растения, отглеждани в разтвор на Knop с *P. sativum*.



Фигура 16 Ефект от третирането с Zn върху общото съдържание на хлорофили в листата на *P. sativum*. Граховите растения се култивират съвместно в три експериментални системи (с Knop, *Coelastrella* sp. BGV и *A. africanum*) и се подлагат на серия от концентрации на $ZnSO_4$ в продължение на седем дни. Параметрите на газообмен са отчетени на ден 5. Данните са представени като средно ± SE. Еднопосочна ANOVA (с post hoc тест на Fisher) е използвана за оценка на различията между експерименталните системи за всяко третиране. Различните букви показват статистически значими разлики при $p < 0,05$.

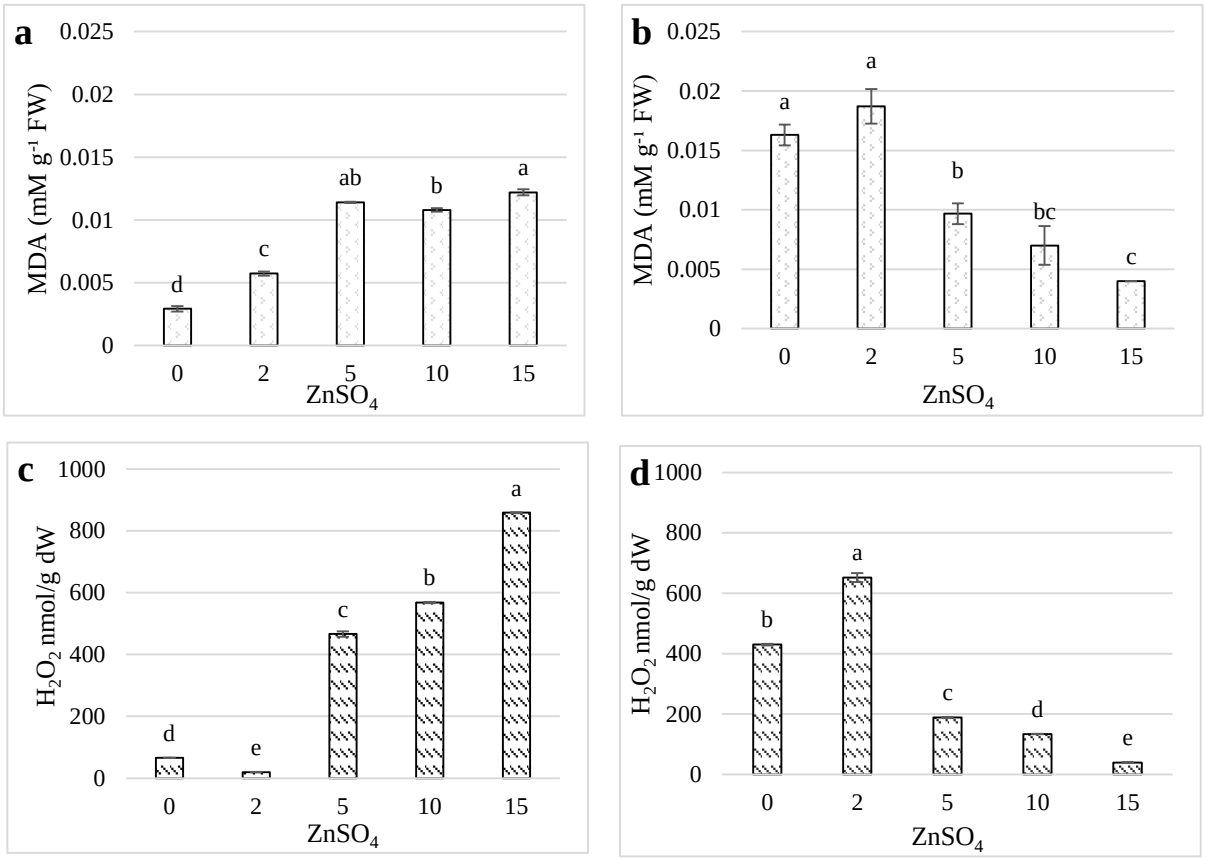
Общото съдържание на хлорофил (CHL) при *P. sativum* остава сравнително стабилно в присъствието на микроводорасли дори при повишени концентрации на Zn^{2+}, което предполага частично забавено развитие на фототоксичния ефект. Вероятна причина за този защитен ефект е създаването на по-алкална и обогатена с кислород среда от страна на *Coelastrella* sp. BGV и *A. africanum*, която благоприятства фотосинтетичната активност и стабилността на хлорофилните пигменти. В допълнение, предишни

проучвания предполагат, че някои микроводорасли синтезират биологично активни метаболити със стимулиращ ефект върху растежа и антиоксидантната защита на растенията при стресови условия (Khudsar et al., 2004; Suresh Kumar et al., 2015; Zhou et al., 2022; Song et al., 2024).

Любопитно е, че дори при отглеждане в среда Knop, без микроводорасли, *P. sativum* демонстрира известна физиологична адаптивност към Zn-индуциран стрес. Тази толерантност вероятно е свързана с инхерентната му антиоксидантна способност, обусловена от наличието на биоактивни молекули като полифеноли, пептиди и полизахариди (Wu et al., 2023). В допълнение, съществуват данни, че кореновата система на *P. sativum* отделя флавоноиди и други ексудати, които потенциално могат да играят роля в установяване на благоприятни взаимодействия с микроводорасли при съвместно култивиране (Ma et al., 2022). Установеното преобладаващо натрупване на Zn^{2+} в корените, съпроводено с ограничен трансфер към надземните части, също сочи към наличие на физиологичен механизъм на толерантност, при който се минимизира навлизането на токсичния метал в фотосинтезиращите тъкани.

4. Изследване на промени в стресовите маркери

Изследвани са промените в нивата на малондиалдехид (MDA) и водороден пероксид (H_2O_2) едни от най-често използваните маркери за степента на липидна пероксидация в клетките **(Фиг. 17).** Промените в MDA и H_2O_2 следват една и съща тенденция в отговора и на двата тест обекта. Отчита се повишаване на нивата при *Coelastrella* sp. BGV при 5mM Zn, докато при *A. africanum* се наблюдава спад на стресовите маркери с повишаване на концентрацията Zn, което може да се дължи на инхибиране на отделянето на кислород. Като отговор на окислително увреждане на мембраните се наблюдава натрупване на MDA в клетките, както и нарастване на H_2O_2 в тях. Високите концентрации на тежкометални йони могат да разрушат нормалната верига за пренос на електрони в микроводораслите чрез заместване на ключови метални йони във физиологичните процеси, което води до прекомерното натрупване на ROS и се индуцира непрекъсната реакция на окисление, причинявайки натрупване на MDA (Pinto et al., 2003). Това означава, че при високи нива на цинков стрес има по-силно окислително увреждане. При *A. africanum* концентрацията на MDA показа различна динамика при третиране с различни Zn концентрации (**Фиг. 17 a, b**).



Фигура 17 Промени в активността на MDA и H_2O_2 в *Coelastrella* sp. BGV **(a, c)** и *A. africanum* **(b, d)** клетки на 7-ия ден след третиране с Zn

Това може да е свързано с различни механизми за справяне с оксидативен стрес, които могат да доведат до промени в синтеза и скоростта на метаболизма на MDA. Сериите от приложен Zn стрес при *Coelastrella* sp. BGV водят до разлика в натрупването на MDA и е очевидно, че стресът е по-ясно изразен при третирането с високите концентрации 10-15мМ Zn. Тези данни кореспондират с намаленото съдържание на пигменти, което инхибира нормалното предаване на фотосинтезиращи електрони, като по този начин разрушава динамичния баланс на ROS в хлоропластите. Подобна тенденция е съобщена и в проучването на Xu et al. (2024), който изследва отговора срещу метални замърсители на *Chromochloris zofingiensis* и установява, че с повишаване на концентрация на метала се натрупва MDA. Rai et al. (2013) съобщава за подобни резултати на линейно нарастване на MDA с повишаване на концентрациите на метални йони в зеленото водорасло *Chlorella vulgaris L.*. Нашите данни кореспондират с редица проучвания за стрес индуцирани високи количества на MDA в *Chlorococcum* sp. AZHB (Qiu et al., 2022), *C. sorokiniana* (Tan et al., 2024) и *P. boryanum* (Chaneva et al., 2009) и други.

5. Ензимна защитна система

Реактивните кислородни видове (ROS), генерирани в отговор на тежкометален стрес, предизвикват сериозни увреждания в клетъчните структури, включително мембрани, протеини и ДНК. За ограничаване на този оксидативен ефект, микроводораслите активират комплексна антиоксидантна защита, включваща както неензимни молекули (напр. глутатион, аскорбат и каротеноиди), така и ензимни компоненти с ключова роля в неутрализирането на ROS (Li et al., 2007). Сред най-важните защитни ензими се открояват супероксиддисмутазата (SOD), каталазата (CAT) и пероксидазите (GPOX), които функционират в координация за елиминиране на най-агресивните кислородни радикали.

В отговор на повишени концентрации на тежки метали, микроводораслите демонстрират индукция на тези ензими като част от адаптивния механизъм за оцеляване. Проучвания с *Chlorella sorokiniana* показват, че с нарастването на концентрацията на тежки метали се наблюдава повишена активност на SOD, което индикира както чувствителността, така и потенциалната толерантност на щама към индуцирания стрес (Tan et al., 2024). Анализът на ензимната активност при различни условия на експозиция предоставя ценна информация за физиологичните механизми на устойчивост при микроводораслите и тяхната приложимост като фикоремедиатори в замърсени среди.

5.1. Ензимна защитна система при водорасли

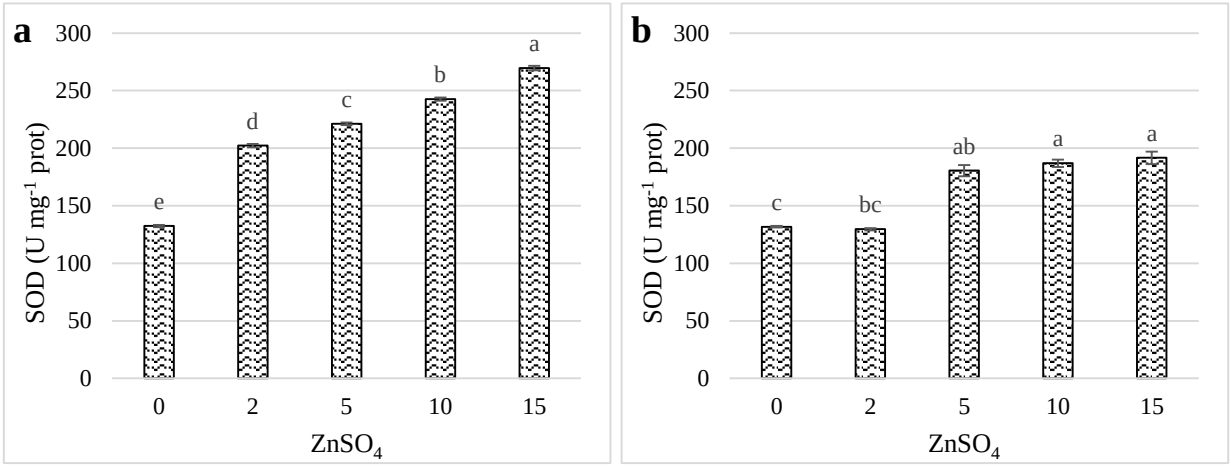
Микроводораслите притежават еволюционно изграден и ефективен ензимен антиоксидантен апарат, който играе съществена роля в ограничаването на увреждванията, причинени от реактивни кислородни видове (ROS) при окислителен стрес. Антиоксидантните ензими функционират като първа защитна линия, неутрализираща токсичните ROS и поддържаща клетъчната редокс хомеостаза (Pinto et al., 2003; Gill & Tuteja, 2010; Cirulis et al., 2013; Saed-Moucheshi et al., 2014; Chokshi et al., 2017; Rezayian et al., 2019; Gauthier et al., 2020). Тази защитна система е особено критична при експозиция на тежки метали, които нарушават метаболитния баланс и индуцират натрупване на ROS.

Според Karna et al. (1999), токсичният ефект на металните йони върху микроводораслите е пряко свързан с индуцираното производство на ROS и последващия дисбаланс в клетъчния редокс потенциал. В настоящото изследване, за да се оцени ефективността на ензимната антиоксидантна реакция, се проследява активността на

трите основни антиоксидантни ензима – каталаза (CAT), пероксидаза (PER) и супероксиддисмутаза (SOD) – на седмия ден от експозицията на водорасловите щамове към Zn^{2+}.

5.1.1. Промени в активността на супероксиддисмутазата

Третирането с тежки метали значително повишава активността на SOD и в двата експериментални щама.



Фигура 18 Промени в активността на супероксиддисмутаза (SOD) в *Coelastrella* sp. BGV **(a)** и *A. africanum* **(b)** клетки на 7-ия ден след третиране с Zn.

Активността на SOD при *Coelastrella* sp. BGV нараства с увеличаване на добавените концентрации Zn и достига стойности, приблизително два пъти по-високи при 15 mM Zn в сравнение с контролата. В клетките на *A. africanum* също се отчита повишаване на нивата на SOD при концентрации 5, 10 и 15 mM Zn **(Фиг. 18).** Цинковият стрес при експерименталните варианти води до изразено стимулиране на антиоксидантния ензимен отговор, който представлява адаптивна реакция към индуцирания оксидативен стрес. Тези резултати показват добра корелация със съдържанието на малондиалдехид (MDA), който се образува в резултат на липидна пероксидация и служи като индиректен маркер за интензивността на оксидативното увреждане.

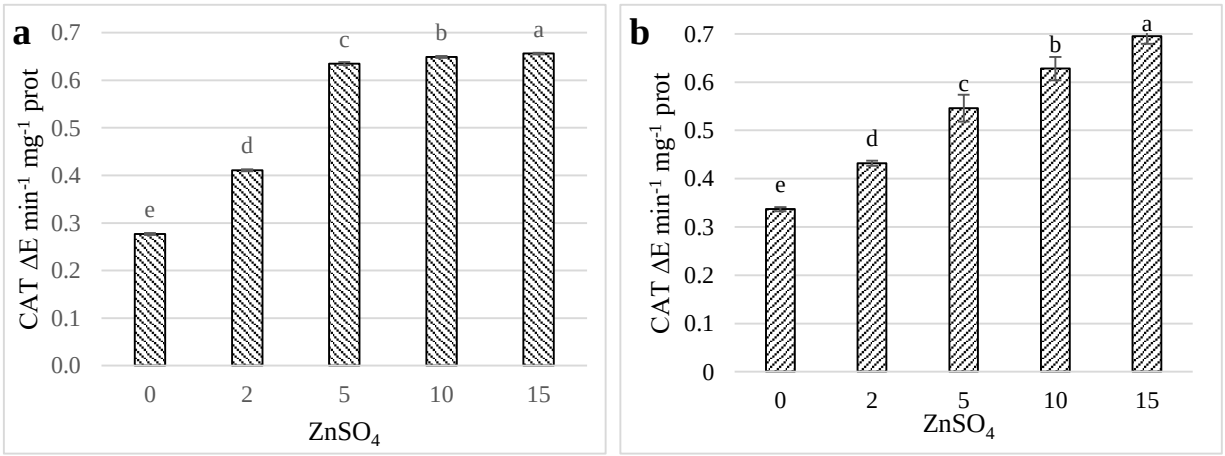
Ролята на супероксид дисмутазата (SOD) е да трансформира токсичния супероксиден радикал ($O_2^{-\bullet}$) във водороден пероксид (H_2O_2), като по този начин се ограничава натрупването на реактивни кислородни видове (ROS) и се намалява липидната пероксидация в клетъчните мембрани. В настоящото изследване се

установява, че при излагане на *A. africanum* и *Coelastrella* sp. BGV на повишени концентрации на Zn^{2+} йони се наблюдава стимулиране на активността на антиоксидантните ензими – SOD, пероксидаза (GPOX) и каталаза (CAT). Това отговаря на установени механизми на защитен отговор срещу тежкометален стрес, описани и в предишни наши наблюдения при експозиция на мед, кадмий и олово (Karcheva et al., 2022).

Получените резултати се потвърждават от публикувани данни на други автори – например Tan et al. (2024) при *Chlorella sorokiniana* и Zhang et al. (2024) при *Graesiella* sp. MA1, където е отчетено повишаване на SOD активността в отговор на цинков стрес. Установената тенденция за нарастване на антиоксидантната ензимна активност при увеличаване на Zn^{2+} концентрацията се свързва с индуцирано свръхобразуване на ROS, което провокира адаптивни защитни реакции в клетките на изследваните видове. В този контекст, ензимите SOD, GPOX и CAT могат да се разглеждат като потенциални биомаркери за биомониторинг на Zn-замърсяване във водни екосистеми.

5.1.2. Промени в активността на каталазата

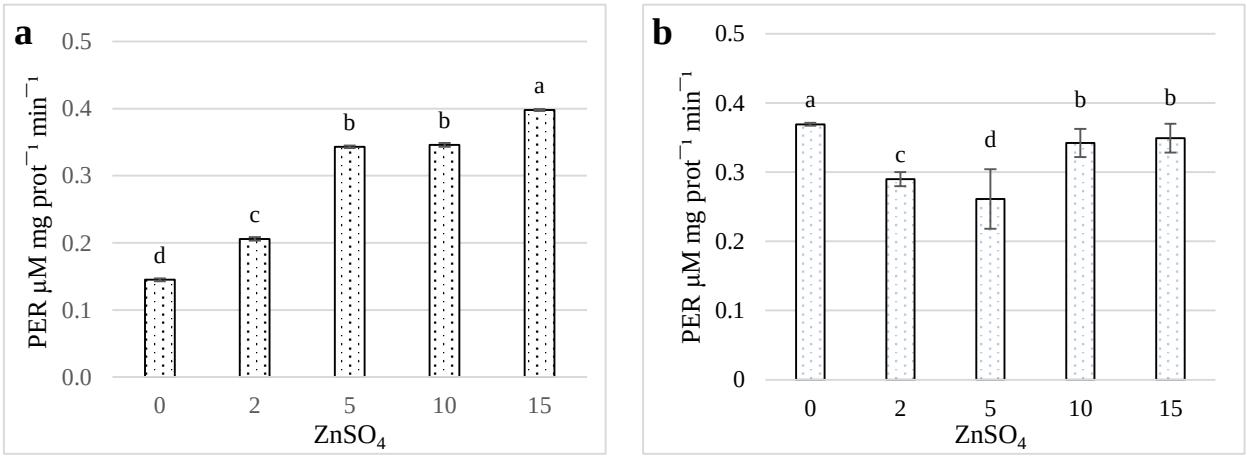
Каталазната активност показва силна специфичност в зависимост от промените в третираснията с различните Zn концентрации И двата тествани обекта отговарят на Zn стрес с повишаване на CAT активността. При *Coelastrella* sp. BGV данните показват стойности два пъти по-високи при 5,10 и 15 мМ третиране в сравнение с контролния вариант **(Фиг. 19)**.



Фигура 19 Промени в активността на каталазата (CAT) в *Coelastrella* sp. BGV **(a)** и *A. africanum* **(b)** клетки на 7-ия ден след третиране с Zn

5.1.3. Промени в активността на гваякол пероксидазата

Нарастващата активност на гваякол пероксидазата (GPOX) в клетките на *A. africanum* с увеличаване на концентрацията на Zn^{2+} корелира с понижаващите се нива на H_2O_2. Вероятно антиоксидантният ефект на GPOX е достатъчен за ефективната детоксикация на водородния пероксид, което обяснява запазването на ензимната активност на ниво, близко до контролната. При *Coelastrella* sp. BGV, от друга страна, се наблюдава необходимост от допълнително активиране на GPOX – активността ѝ нараства успоредно с концентрацията на Zn^{2+}, което предполага компенсаторна роля в условия на засилен оксидативен стрес и допълване на ограничената ефективност на другите защитни механизми.



Фигура 20 Промени в активността на гваякол пероксидазата (GPOX) в *Coelastrella* sp. BGV **(a)** и *A. africanum* **(b)** клетки на 7-ия ден след третиране с Zn

Получените резултати демонстрират активиране на антиоксидантната ензимна система като част от клетъчния отговор към Zn-индуциран стрес. При *A. africanum*, с повишаване на концентрацията на Zn^{2+} се отчита и увеличаване на активността на каталаза, което съответства на тенденцията за намаляване на H_2O_2. Това подсказва, че при този вид действието на CAT е водещо в елиминирането на водородния пероксид, поради което GPOX остава с относително стабилна активност.

В клетките на *Coelastrella* sp. BGV се наблюдава различен модел на отговор. Активността както на CAT, така и на GPOX се повишава значително, като достига до около два пъти по-високи стойности спрямо контролата. Това съвпада с отчетения рязък скок в съдържанието на H_2O_2 при високи концентрации на Zn^{2+}. Повишената пероксидазна активност очевидно допринася за допълнителна редукция на водородния

пероксид, надхвърляща капацитета на CAT. Предполагаме, че това представлява физиологичен компенсаторен механизъм за справяне с индуцирания от цинк оксидативен стрес, по-ясно изразен при *Coelastrella* sp. BGV.

Тези наблюдения се подкрепят от проучването на Qiu et al. (2022), които описват повишена активност на GPOX и SOD, както и сравнително по-значимо активиране на CAT при зеления микроводораслев вид *Chroococcum* sp. AZHB в условия на тежкометален стрес. Подобни резултати относно антиоксидантния отговор срещу ROS съобщава и Tan et al. (2024) при цианопрокариотния щам *C. sorokiniana*.

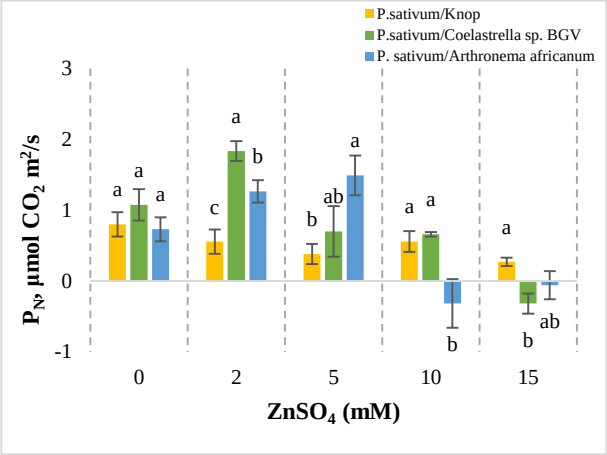
Резултатите от изследване на зеленото микроводорасло *Pseudokirchneriella subcapitata*, където се отчита високи нива на каталаза в отговор на тежкометален срес също кореспондират с нашите данни (Soto et al., 2011). В изследване на Chaneva et al. (2009), с цианопрокариотния щам *C. sorokiniana* и на (Romero-Cruz et al., 2024) с *Coccomyxa onubensis*, също се докладва за регулирането на оксидативен стрес с помощта на антиоксидантни ензими.

6. Изследване на ключови физиологични параметри в грахови растения след третиране с Zn

За оценка на физиологичния отговор на *P. sativum* към Zn-индуциран стрес в моделните ко-културационни системи, параметрите на листен газообмен (нетна фотосинтетична скорост, транспирация и проводимост на устицата) са отчетени на петия ден от експеримента. Този времеви момент е избран въз основа на предварителни наблюдения, показващи, че до ден 5 растенията демонстрират стабилно развитие и изразен отговор към приложените концентрации на Zn, без прояви на тежка токсичност, която би могла да изкриви физиологичните измервания. Освен това, на този етап се наблюдава активна фаза на взаимодействие между микроводораслите и висшето растение, което позволява прецизна оценка на потенциалния защитен ефект от ко-културирането. Избягването на по-късен момент, като ден 7, цели минимизиране на влиянието на напреднала тъканна дегенерация или метаболитен сриv, които биха могли да повлияят значително на надеждността на физиологичните данни.

6.1. Промени в скоростта на нетна фотосинтеза

В контролната експериментална система (*P. sativum*/Knop) не се наблюдават значителни промени в параметрите на газообмена в листата на грах (**Фиг. 21**).



Фигура 21 Ефект от третирането с Zn върху Нетна скорост на фотосинтеза (P_N) в листата на *P. sativum*. Граховите растения се култивират съвместно в три експериментални системи (с Knop, *Coelastrella* sp. BGV и *A. africanum*) и се подлагат на серия от концентрации на $ZnSO_4$ в продължение на седем дни. Параметрите на газообмен са отчетени на ден 5. Данните са представени като средно ± SE. Еднопосочна ANOVA (с post hoc тест на Fisher) е използвана за оценка на различията между експерименталните системи за всяко третиране. Различните букви показват статистически значими разлики при $p < 0,05$.

Най-високата нетна скорост на фотосинтеза (P_N) е регистрирана при концентрация от 2 mM $ZnSO_4$ в системите за съвместно култивиране с микроводорасли, като ефектът е най-силно изразен при присъствие на *Coelastrella* sp. BGV. Данните сочат, че ко-култивацията с този зелен микроводораслов щам води до приблизително двукратно повишение на P_N в *P. sativum* в сравнение с контролата, докато при *A. africanum* ефектът е умерен – около 1,5-кратно увеличение. При третиране с 5 mM $ZnSO_4$ положителното влияние на микроводораслите върху фотосинтетичната активност се запазва, като *A. africanum* показва по-изразен стимулиращ ефект.

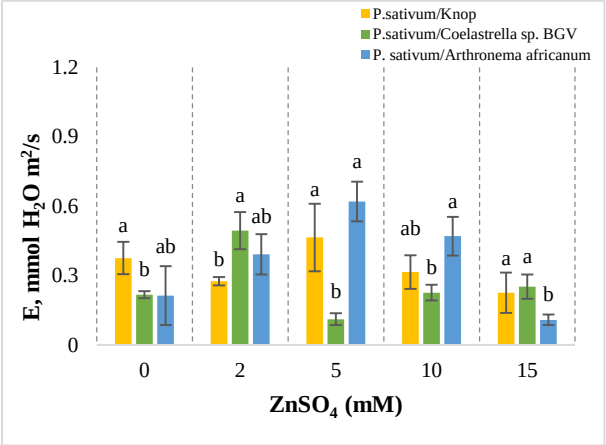
В условията на високи концентрации на $ZnSO_4$ (10 и 15 mM), фотосинтетичната активност на граховите растения е значително потисната, независимо от присъствието на микроводорасли. Това предполага, че при интензивен Zn стрес, защитните механизми, инициирани от микроводораслите, са недостатъчни за компенсиране на фототоксичния ефект на метала и дори могат да бъдат преустановени или да влошат състоянието на висшето растение.

Излишъкът на Zn нарушава усвояването на вода и функцията на устицата, което води до намалена фотосинтеза и понижена биомаса (Kaur & Garg, 2021). Известно е, че

Zn токсичността намалява нетната фотосинтеза, но основните механизми – независимо дали са свързани с проводимостта на устицата, мезофила, фотохимията или биохимията – остават неясни (Misra et al., 2005; Gaur & Dhankhar, 2009; Fatemi et al., 2020). Например, (Misra et al., 2005) наблюдават при *Pelargonium graveolens*, че третирането със Zn ограничава проводимостта на устицата, ограничава дифузията на CO_2 в листата и инхибира фотосинтезата. (Fatemi et al., 2020) също свързват високите концентрации на Zn^{2+} при *Brassica rapa L.* с намалена проводимост на устицата, ограничено развитие на корените и понижени скорости на фотосинтеза.

6.2. Промени в транспирацията

Скоростта на транспирация (E) на *P. sativum* не се повлиява сериозно от $ZnSO_4$ в контролната моделна система на *P. sativum*/Knop **(Фиг. 22)**.



Фигура 22 Ефект от третирането с Zn върху скоростта на транспирация в листата на *P. sativum*. Граховите растения се култивират съвместно в три експериментални системи (с Knop, *Coelastrella* sp. BGV и *A. africanum*) и се подлагат на серия от концентрации на $ZnSO_4$ в продължение на седем дни. Параметрите на газообмен са отчетени на ден 5. Данните са представени като средно ± SE. Еднопосочна ANOVA (с post hoc тест на Fisher) е използвана за оценка на различията между експерименталните системи за всяко третиране. Различните букви показват статистически значими разлики при $p < 0,05$.

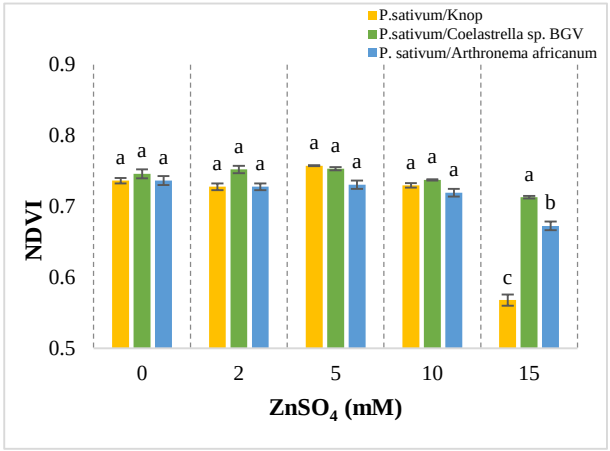
Наблюдава се положителен ефект по време на съвместно култивиране с микроводорасли при 2 mM $ZnSO_4$, което води до 30–40% повишаване на транспирацията. При по-високи концентрации (5 и 10 mM $ZnSO_4$), *A. africanum* допринася за поддържане на транспирацията на растенията, докато *Coelastrella* sp. BGV предизвика по-бърз спад в този параметър. При 15 mM $ZnSO_4$ ефектът на *Coelastrella* sp. BGV се стабилизира близо

до контролните нива, докато *A. africanum* причинява намаляване на транспирацията само при тази концентрация.

Интересното е, че степента на транспирация при ниски нива на Zn се увеличава, което е съпроводено с подобрена производителност на растенията. Въпреки това, при високи дози от тежкия метал се наблюдават увреждания, изразяващи се в понижени скорости на фотосинтеза.

6.3. Нормализиран индекс на вегетационната разлика

Нормализираният индекс на вегетационната разлика (NDVI) е индикатор за физиологичното състояние на растенията, показва подобни стойности в тестваните системи **(Фиг. 23)**.



Фигура 23 Ефект от третирането с Zn върху промените в нормализираният индекс на вегетационната разлика (NDVI). в листата на *P. sativum*. Граховите растения се култивират съвместно в три експериментални системи (с Knop, *Coelastrella* sp. BGV и *A. africanum*) и се подлагат на серия от концентрации на $ZnSO_4$ в продължение на седем дни. Параметрите на газообмен са отчетени на ден 5. Данните са представени като средно ± SE. Еднопосочна ANOVA (с post hoc тест на Fisher) е използвана за оценка на различията между експерименталните системи за всяко третиране. Различните букви показват статистически значими разлики при $p < 0,05$.

Въпреки това, при 15 mM $ZnSO_4$ се наблюдава рязък спад от 78% в NDVI в контролната система *P. sativum*/Knop. Обратно, стойностите на NDVI остават относително високи в присъствието на *Coelastrella* sp. BGV и *A. africanum*, което показва успешно адаптиране на грахови растения в системи за съвместно култивиране на микроводорасли при стрес, предизвикан от Zn.

7. Съдържание на тежки метали - във водорасли и висши растения

7.1. Натрупване на Zn в биомасата на експериментални видове водорасли

Физиологичните промени, наблюдавани при *Coelastrella* sp. BGV и *A. africanum* предполагат, че Zn влияе върху метаболитните процеси в клетките на водораслите чрез различни механизми. Това се подкрепя от разликите в способността им да натрупват тежки метали от хранителната среда. И двете микроводорасли показват висок капацитет за абсорбция на метални йони, като *A. africanum* показва по-голяма склонност да натрупва Zn в своята биомаса в сравнение с *Coelastrella* sp. BGV **(Табл. 5)**.

Таблица 5 Натрупване на Zn (g/kg) в биомасата на *Coelastrella* sp. BGV на 7-ми ден****Други елементи са показани за сравнение.***

$ZnSO_4$	P %	Fe, mg/kg	Cu, mg/kg	Mn, mg/kg	Zn, g/kg	Mg, mg/kg	Ca, mg/kg
0 mM	1,64	3748	70,1	2,16	**1,74**	8241	950
2 mM	2,19	2527	49,4	3,57	**106,11**	4514	693
5 mM	2,26	2214	45,9	0,96	**127,60**	4505	519
10 mM	1,33	1611	36,3	<0,2	**139,58**	2204	365
15 mM	1,18	1238	30,7	<0,1	**143,14**	1425	138

Таблица 6 Натрупване на Zn (g/kg DW) в биомасата на *A. africanum* на 7-ми ден. ****Други елементи са показани за сравнение.***

$ZnSO_4$	P%	Fe, mg/kg	Cu, mg/kg	Mn, mg/kg	Zn, g/kg	Mg, mg/kg	Ca, mg/kg
0 mM	2,59	4094	346	6459	**1,51**	6483	774
2 mM	6,56	2483	233	4308	**134,42**	4125	425
5 mM	7,87	2768	298	3372	**166,90**	1580	274
10 mM	7,79	2880	273	2733	**169,73**	955	210
15 mM	7,81	3707	262	2327	**189,47**	850	262

В съответствие с натрупването на биомаса **(Фиг. 11b)**, инхибирането на растежа при *A. africanum* съвпада с отчетливо понижение в абсорбцията на фосфор (P) и желязо (Fe). При същия щам се наблюдава ускорено намаление в съдържанието на калций (Ca) в културалната среда, което предполага нарушено усвояване или пренасочване на калциевия метаболизъм под въздействие на Zn. Концентрациите на магнезий (Mg) обаче остават стабилни или леко повишени, което може да се свърже с ролята на Mg в

поддържането на фотосинтетичната активност и ензимна стабилност при метален стрес (Rout & Das, 2009; Anjum et al., 2015).

За разлика от това, при *Coelastrella* sp. BGV натрупването на Zn води до изразен дисбаланс в съдържанието на макроелементи, включително отчетлив дефицит на основни хранителни йони. Това вероятно отразява по-чувствителна йонна хомеостаза и по-слаби компенсаторни механизми за хранителен транспорт в сравнение с цианопрокариотния щам.

По подобен начин фитопланктонът *Tetraselmis sp.* демонстрира висока устойчивост на Zn в сравнение с други видове (Dinesh et al., 2014). Други проучвания, като тези на Santos et al. (2019), подчертават способността на *C. vulgaris* да расте в среди, богати на Zn^{2+}, което потвърждава потенциала ѝ за биовъзстановяване.

Сред цианопрокариотите е доказано, че *Lyngbya taylorii* притежава висок адсорбционен капацитет за тежки метали (Pb, Cd, Ni, Zn), лесно култивиране, лесно отделяне и висок добив на биомаса (Klimmek et al., 2001) Паралелен анализ на *A. africanum* показва умерена способност за асимилация на тежки метали.

Резултатите от дисертационния труд демонстрират, че зеленото водорасло *Coelastrella sp. BGV* демонстрира по-голяма толерантност към повишени нива на Zn^{2+} в сравнение с цианопрокариотния щам през целия експериментален период. Тези открития съвпадат с предишни проучвания, които показват, че по-ниските дози микроелементи често стимулират растежа на микроводораслите, докато по-високите дози го инхибират, като ефектите варират в зависимост от металния йон и щама/вида водорасли (Gao et al., 2004). Например Mathimani et al. (2023), не отчитат видим стрес, предизвикан от Zn върху зелените водорасли *Selenastrum sp.*, които запазват постоянен растеж при всички тествани концентрации на Zn^{2+}.

7.2. Натрупване на Zn в биомасата на *P. sativum*

В контролните варианти и двете водорасли показват фитозащитна роля върху натрупването на Zn в корените на граха, което корелира с наблюдавания на положителен ефект върху растежа на растенията. Прекомерните концентрации на Zn (10 и 15 mM) причиняват видимо увреждане на листата и корените, което показва натрупване на Zn. Анализът на разпределението на Zn в растителните органи разкри по-високо натрупване на метала в корените в сравнение с надземните части и при трите експериментални системи.

Таблица 7 Натрупване на Zn (g/kg DW) в надземните части и корените на *P. sativum* на ден 7

	***P. sativum*/ Knop**		***P. sativum*/ *Coelastrella* sp. BGV**		***P. sativum*/ *Arthronema africanum***	
	Zn, g/kg in *P. sativum*					
$ZnSO_4$	aerial parts	roots	aerial parts	roots	aerial parts	roots
0 mM	0,14	3,77	0,19	0,74	0,13	1,73
2 mM	0,48	9,93	0,38	12,68	0,43	23,96
5 mM	5,05	13,74	4,16	24,61	4,06	35,62
10 mM	2,25	18,47	0,84	11,59	0,26	19,26
15 mM	8,14	24,21	5,72	37,83	10,95	49,08

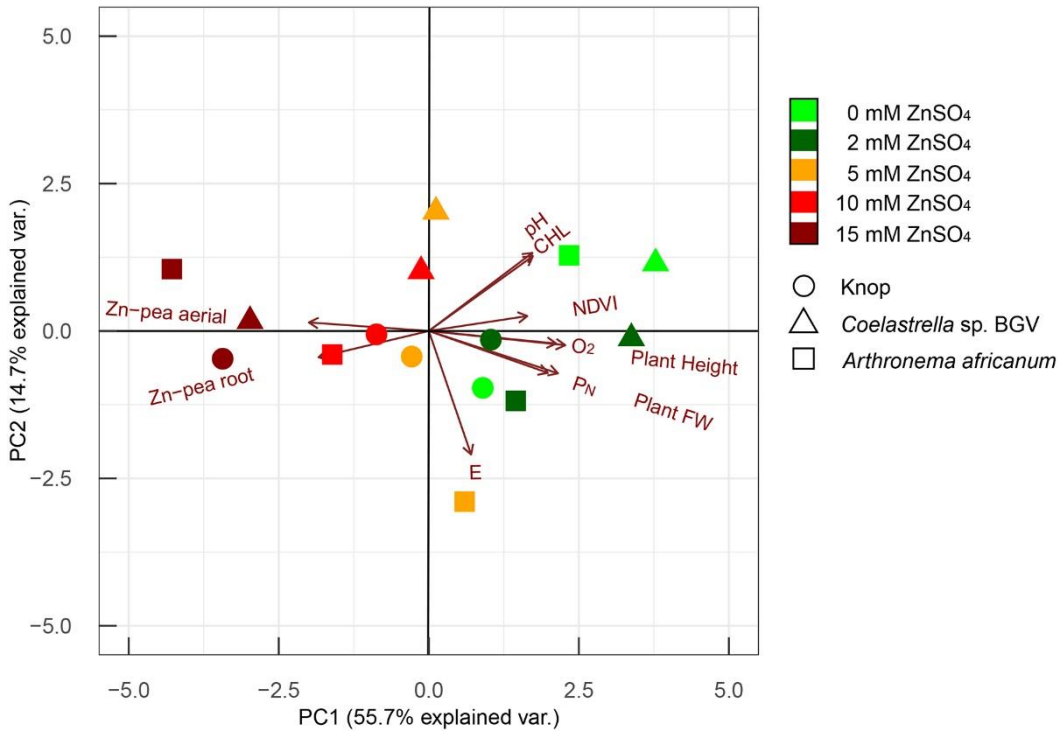
Andrejić et al. (2018) установяват, че *Miscanthus giganteus* акумулира цинк неравномерно в различните органи. Въпреки отчетеното намаление в газообмена, проводимостта на устицата за водни пари и фотосинтетичната активност под влияние на Zn, растението запазва висок фотосинтетичен капацитет, което подчертава неговата висока степен на толерантност към тежкометален стрес.

По сходен начин *P. sativum* показва устойчивост при прекомерни концентрации на Zn^{2+}, като системите за съвместно култивиране частично облекчават токсичността на Zn.

От получените резултати може да се обобщи, че при продължително излагане на Zn може да възникне минерален дефицит в растенията, подобен на наблюдаваното в биомасата на водораслите, където постепенно намаляват основни елементи като Fe, Cu, Mn, Mg и Ca.

8. Анализ на главните компоненти

Анализът на главните компоненти (PCA) улеснява визуализацията на цялостното сравнение между експерименталните варианти. 70,4% от общата вариация на данните се обяснява с комбинираните първи и втори основни компоненти (PC): съответно 55,7% и 14,7% (**Фиг. 24**). Дължината и ориентацията на параметърния вектор в координатната система PC1/PC2 отразява нивото на принос на съответния параметър към тях: колкото по-дълъг е векторът и колкото по-голяма е близостта му до ос, толкова по-голям е неговият принос към съответния PC. Всички параметри освен транспирацията, pH и общото хлорофилно съдържание определят предимно PC1, докато E – PC2; и pH и общото хлорофилно съдържание влияят еднакво и на двете. Разликите между отделните експериментални системи с нарастващи концентрации на Zn са силни и се отразяват по PC1 – неговите отрицателни стойности са свързани с по-високо съдържание на Zn.



Фигура 24 *PCA от 10 експериментални параметъра, представящи разликите между системите за съвместно култивиране при нарастващи концентрации на Zn. Вариантите са дадени като фигури (кръгове – Knop, триъгълници –* Coelastrella *sp. BGV, квадрати –* A. africanum*), оцветени в зависимост от приложената концентрация на Zn, докато параметрите са дадени като вектори. Припокриващите се вектори съответстват на параметри с висока положителна корелация; линейно противоположни вектори сочат към силно отрицателно корелирани променливи; и ортогонално разположени променливи характеризират без корелация между тях.*

PCA ясно показва, че високите нива на Zn водят до забавяне на растежа на *P. sativum* и натрупване на метала в корена и надземната част. Zn защитният ефект от съвместното култивиране на микроводорасли се наблюдава за всички третирания с $ZnSO_4$ за *Coelastrella* sp. BGV и до 5 mM за *A. africanum*.

Анализът на главните компоненти (PCA) разкрива изразена положителна корелация между съдържанието на разтворен кислород в средата и физиологичните показатели на растението, включително височина, свежа биомаса, нетна фотосинтетична активност (P_N) и NDVI стойности. Стойностите на pH и общото хлорофилно съдържание също проявяват съществена взаимовръзка, което предполага общ механизъм на метаболитен отговор към условията на Zn стрес. За разлика от тях, транспирационната активност не показва статистически значима корелация с останалите изследвани параметри.

VI. ИЗВОДИ

1. Добавянето на кадмий и олово потиска растежа и белтъчното съдържание в клетките на *A. africanum* и *Coelastrella* sp. BGV. За разлика от тях внасянето на мед в началните етапи на експеримента оказва стимулиращ ефект върху растежа на *Coelastrella* sp. BGV.

2. Биосинтезата на фотосинтетичните пигменти се понижава при третиране с кадмий и олово, докато каротеноидният синтез нараства, по-изявено при *Coelastrella* sp. BGV. Специфичните за цианопрокариота фикобилипротеини се увеличават след обработка с мед и олово.

3. Антиоксидантните ензими на *A. africanum* проявяват най-голяма активност след експозиция на кадмий. В следствие на третиране с високите дози мед и олово се наблюдава повишена активност на антиоксиднатната защитна система при *Coelastrella* sp. BGV, което корелира с повишените нива на стресовите маркери.

4. Третирането с мед, кадмий и олово индуцира по-силен стресов отговор в цианопрокариотния щам. От друга страна *Coelastrella* sp. BGV, демонстрира по-висок потенциал за абсорбция на тежки метали, като Pb се натрупва в най-големи количества, следван от Cd и Cu.

5. Нивата на pH в кокултивационните системи остават константни при Knop, докато при съвместното култивиране на граха с водораслите по-високи нива на pH има при *Coelastrella* sp. BGV.

6. Третиранията в серия от цинкови концентрации водят до различно кислородно съдържание в моделните системи. При 2 и 5 mM Zn нивата на кислород се

повишават, особено при цианопрокариота който произвежда повече кислород от *Coelastrella* sp. BGV.

7. В хода на третирането високите цинкови концентрации оказват инхибиращ ефект върху растежа на водораслите, по-ясно подчертан при *A. africanum*. Биосинтезата на пигменти показва обратна зависимост и по-високи стойности на хлорофили и каротеноиди при *A. africanum*. Третирането с 5 mM Zn оказва силно стимулиращо действие и нивата на каротеноидите при цианопрокариота се повишават в динамика на експеримента. Специфичните за *A. africanum* пигменти са силно понижени след прибавяне на 10 и 15 mM Zn.

8. В моделните системи за съвместно култивиране растежът на *P. sativum* е значително стимулиран при третиране с цинкови концентрации до 2 mM $ZnSO_4$, като се отчита съществено увеличение спрямо контролната система. При по-високи концентрации на Zn ($\geq$ 5 mM) се наблюдава ранно инхибиране на растежа, измеримо още на третия ден от експозицията. Въпреки това, при 5 mM $ZnSO_4$ съвместното култивиране с *A. africanum* демонстрира по-високи стойности на растеж в сравнение с останалите системи, което потвърждава защитната роля на този щам при умерен метален стрес.

9. При ниски дози на експозиция на Zn се отчита стимулиращ ефект на пигментната бисинтеза при *P. sativum* в моделна система с *Coelastrella* sp. BGV, при 2 mM се регистрира и най-висока скорост на P_N и транспирацията се повишава ≈30-40%.

10. При микроводораслите биоакумулирането на цинк е по-изразено при *A. africanum*. При *P. sativum* 10 и 15 mM Zn оказват значителни увреждания на листата и корените, което е причинено от засилено акумулиране на Zn.

VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Микроводораслите представляват изключително разнообразна и метаболитно активна група микроорганизми, обединяваща хиляди родове и видове с уникални физиолого-биохимични характеристики и широк спектър от биотехнологични приложения. Задълбоченото изследване на това разнообразие е от ключово значение за пълното разгръщане на потенциала им в индустриални процеси, екологични решения и стратегии за устойчиво развитие (Barra & Greco, 2023).

Настоящият дисертационен труд допринася към разбирането на клетъчните механизми, свързани със стресовия отговор на микроводорасли при експозиция на тежки метали, и очертава перспективите им като ефективни биоинструменти във фикоремедиационни технологии. Двата изследвани щама – представител на цианопрокариотите и зелено микроводорасло – демонстрират различна физиологична реактивност спрямо тривалентни йони на Cu^{2+}, Cd^{2+} и Pb^{2+}. Получените резултати разкриват отчетливи вариации в темповете на растеж, в състава на биомасата и в активността на антиоксидантната система.

Наблюдаваните различия в способността на щамовете да усвояват и задържат тежки метали предполагат възможността за видово-специфични взаимодействия между определени метални йони и компоненти на клетъчната повърхност или вътрешноклетъчни механизми. Сред тестваните метали, кадмият и оловото се проявяват като най-силно токсични, като инхибират растежа и синтеза на фотосинтетични пигменти, докато едновременно индуцират засилена антиоксидантна реакция, включително натрупване на MDA и повишена активност на ензими като SOD, CAT и GPOX и при двата експериментални щама.

Получените резултати потвърждават, че микроводораслите притежават значителен антиоксидантен капацитет и могат да бъдат надеждни биоинструменти за фикоремедиация на среди, замърсени с цинкови йони. При наличие на Zn^{2+} в средата се наблюдават видово специфични различия в съдържанието на фотосинтетични пигменти – *Coelastrella sp. BGV* проявява по-ниски стойности спрямо *A. africanum*, при който се отчита повишено натрупване на каротеноиди. Тези данни подчертават ролята на пигментната и антиоксидантната системи в адаптивния отговор на микроводораслите към Zn-индуциран окислителен стрес.

Изследването показва, че и двата щама могат да компенсират въздействието на Zn до концентрация 5 mM чрез активация на ензимната антиоксидантна защита,

включително CAT, SOD и GPOX. При по-високи концентрации обаче се регистрира повишено образуване на реактивни кислородни форми, отразено в натрупване на водороден пероксид (H_2O_2) и малондиалдехид (MDA), особено при *Coelastrella sp. BGV*, което предполага засилена ангажираност на антиоксидантната система в неутрализирането на клетъчните увреждания.

Получените данни потвърждават ефективността на микроводораслите като фикоремедиатори. Макар *A. africanum* да проявява по-висока чувствителност към Zn, той демонстрира значително по-голям капацитет за натрупване на метала в клетъчната си биомаса. От друга страна, *Coelastrella sp. BGV* се характеризира с по-висока физиологична устойчивост към Zn-индуцирания окислителен натиск, което го определя като подходящ кандидат за приложение в биотехнологични стратегии за пречистване на среди с висока цинкова концентрация, без риск от значителни метаболитни нарушения. В съвместната култивационна система на *P. sativum* с *Coelastrella sp. BGV* се наблюдава смекчаване на токсичните ефекти на цинка, което се изразява в поддържане на физиологичната активност и растежа на растенията. Присъствието на микроводорасли в средата вероятно подобрява нейните физикохимични параметри чрез отделяне на биологично активни метаболити и поддържане на по-благоприятна йонна и газова среда, което създава условия за повишена устойчивост на граха към металния стрес.

Наблюдаваното инхибиране на Zn-натрупването в надземните части на *P. sativum* и тенденцията за задържане на метала предимно в кореновата система предполагат наличието на физиологични механизми за ограничаване на цинковата транслокация към фотосинтетично активните тъкани – процес, който допринася за редуциране на клетъчното увреждане и поддържане на фотосинтетичния капацитет. На базата на тези резултати може да се заключи, че *Coelastrella sp. BGV* и *A. africanum* притежават високо адаптивен и приложим потенциал за екологосъобразни биотехнологични решения.

Настоящото проучване допринася към задълбочаването на знанията за физиологичните и молекулни механизми, чрез които микроводораслите и растенията взаимодействат в условия на тежкометален стрес. Въз основа на експериментално установените зависимости се предлагат научно обосновани насоки за бъдещи изследвания и практическо прилагане на фикоремедиацията в устойчиви земеделски и екологични стратегии.

VIII. ПРИНОСИ

С оригинален характер:

1. За първи път в България са получени данни за биоакумулация на тежки метали при *A. africanum* и *Coelastrella* sp. BGV култивирани в условия на стрес предизвикан от Cu, Cd, Pb и Zn.

2. Изследвани са промените в растежа и физиологичните показатели на микроводораслите и висшите растения, което допринася за изясняването на преимуществата на съвместни подходи на култивиране.

3. За първи път са характеризирани промените в активността на основни антиоксидантни ензими (SOD, CAT, GPOX) при *A. africanum* и *Coelastrella* sp. BGV в отговор на преодоляване на неблагоприятни условия индуцирани от тежкометален стрес.

4. Установени и съпоставени са физиолого-биохимичните изменения, протичащи при експозиция на тежки метали както при микроводораслите, така и в различните органи на висшето растение.

5. Установени са специфични физиолого-биохимични характеристики на слабоизследвания цианопрокариотен щам *A. africanum*, с потенциал за приложение във фикоремедиационни технологии. Допълнително са разширени и обогатени биохимичните данни за българския щам зелено микроводорасло *Coelastrella* sp. BGV.

6. Конструирани експериментални моделни системи в стрес индуцирани условия предизвикани от Zn с микроводораслите *A. africanum* и *Coelastrella* sp. BGV и висшето растение *P. sativum*. Оценена е биоакумулацията на тежки метали в изследваните видове.

7. За първи път е изследван физиологичният отговор при съвместно култивиране на *A. africanum* и *Coelastrella* sp. BGV с *P. sativum* в моделни системи под влияние на тежки метали, с цел оценка на потенциала на микроводораслите за ограничаване на токсичните ефекти и улесняване на адаптивните механизми при висшите растения при токсичен стрес.

С потвърдителен характер:

1. Потвърдено е повишено натрупване на каротеноиди в микроводораслите *Coelastrella* sp. BGV и *A. africanum* при експозиция на тежки метали, като индикатор за активиране на неензимната антиоксидантна защита.

ПУБЛИКАЦИИ СВЪРЗАНИ С НАСТОЯЩИЯ ТРУД И ЗАБЕЛЯЗАНИ ЦИТИРАНИЯ

Публикации пряко свързани с темата:

- **Z. Karcheva,** Z. Georgieva, D. Petrova, M. Zhiponova, G. Chaneva, **(2025).** "Microalgal oxidative stress response to Zn toxicity.", *Oxid. Comm*, vol:48, issue 1, pages:92-104, ISSN 0209-4541, Ref, SCOPUS, SJR (0.18 - 2023),

- **Z. Karcheva,** Z. Georgieva, A. Tomov, D. Petrova, M. Zhiponova, I. Vasileva, G. Chaneva **(2022).** „Heavy metal stress response of microalgal strains *Arthronema africanum* and *Coelastrella* sp. BGV.", BioRisk, vol:17 Special Issue, pages:83-94, doi:doi: 10.3897/biorisk.17.77483, Ref, DOI: 10.3897/17.77483, IF=1.17 SCOPUS **Quartile: Q2 (2022)**, PhD

Забелязани цитирания:

- **В статии**

1. Khaoula Lassoued, Mouna Mahjoubi, Elias Asimakis, Naima Bel Mokhtar, Panagiota Stathopoulou, Refka Ben Hamouda, Olfa Bousselmi, Ramona Marasco, Ahmed Slaheddine Masmoudi, Daniele Daffonchio, George Tsiamis, Ameur Cherif, Diversity and networking of uni-cyanobacterial cultures and associated heterotrophic bacteria from the benthic microbial mat of a desert hydrothermal spring, FEMS Microbiology Ecology, Volume 100, Issue 12, December **2024,** fiae148, https://doi.org/10.1093/femsec/fiae148

2. Beaulier, Camillea, Dannay, Mariea, Devime, Fabiennea, Galeone, Adriena, Baggio, Céliaa, El Sakkout, Nabilaa, Raillon, Camillea, Courson, Olivierb, Bourguignon, Jacquesa, Alban, Claudea (2023). "Characterization of a uranium-tolerant green microalga of the genus Coelastrella with high potential for the remediation of metal-polluted waters." J. Science of the Total Environment, vol. 908, 168195, https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.168195

3. Kadam, R.V., Rani, V., Padmavathy, P. *et al.* Assessment of heavy metals and environmental stress conditions on the production potential of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) in indigenous microalgae isolated from the Gulf of Mannar coastal waters. *Environ Monit Assess* **196**, 301 **(2024).** https://doi.org/10.1007/s10661-024-12447-y

4. Kamaliya, S. N., Jhala, Y. K., Patel, H. K., Kumar, D., Sharmathy, V., & Vyas, R. V. **(2024).** Isolation and characterization of native microalgae with potential for phycoremediation of heavy metal contaminated water. *Phycologia*, *63*(4), 369–377. https://doi.org/10.1080/00318884.2024.2376301

5. Vasileva, I., & Gigova, L. **(2023).** Microalgae -- Promising Renewable Biological Resources. In *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans* (Vol. 26, Issue 2, pp. 324–359). ISSN (Print): 1311-0489 ISSN (Electronic): 2367-8364

6. Кадырова Г.Х. Тургунова Л.С. Шонахунов Т.Э. Садуллаева М.С. Усмонкулова А.А. **(2024).** „Физиолого-биохимические свойства микроводорослей в условиях загрязнения ионами тяжельх металлов меди, кобальта, кадмия и свинца." Universum: химия и

биология: электрон. научн. журн. Кадырова Г.Х. [и др.]. 2024. 2(116). DOI: 10.32743/UniChem.2024.116.2.16724

- **В дисертационен труд:**

1. Lavrinovičs, A. **(2023).** MICROALGAL TECHNOLOGY FOR MUNICIPAL WASTEWATER POST-TREATMENT. https://doi.org/10.7250/9789934228643 ISBN 978-9934-22-864-3

УЧАСТИЕ В НАУЧНИ ФОРУМИ И НАУЧНО-ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКИ ПРОЕКТИ ПРЯКО СВЪРЗАНИ С ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Работата в дисертационния труд е подкрепена чрез научно-изследователски проекти по Фонд научни изследвания на СУ „Св. Кл. Охридски“ в подкрепа на докторанти:

1. „Физиологичен отговор на кокултивационната система микроводорасло/висше растение срещу Zn токсичност “, **(2024).** Член, Договор №80-10-119/16.04.2024
2. „Възможности за приложение на перспективни щамове микроводорасли в процесите на фикоремедиация", **(2022).** Член, Договор № 80-10-13/10.05.2022г.
3. “Сравнителен анализ на стресовия отговор при прокариотни и еукариотни микроводорасли след третиране с тежки метали “, **(2021).** Член, Договор № 80-10-76/25.03.2021г.

Други участия в проекти, непряко свързани с дисертационния труд:

- “Модулиране на As токсичност чрез метода на фикоремедиацията“, **(2023).** Член, Договор № 80-10-68/25.05.2023г.
- ФНИ МОН: КП-06-Н56/9 12.11.2021 „Интердисциплинарен биотехнологичен подход за анализ и модулиране на биологичния потенциал на медицинското растение *Nepeta nuda*“; 2021- 2024 г. (Interdisciplinary biotechnological approach for analysis and modulation of the biological potential of the medicinal plant *Nepeta nuda*).

Резултатите от експериментите са представяни на национални и международни научни форуми и конференции:

1. **Karcheva, Z.,** Georgieva, Zh., Chaneva, G., Petrova, D., Zhiponova, M., Toshkova-Yotova, T., Pilarski, P. **(2022).** “Stress response of microalgal strain *Arthronema africanum* against heavy metal toxicity of zinc sulfate.”, National conference Kliment’s days. 4 November 2022 Sofia, Bulgaria
2. **Карчева, З.,** Георгиева, Ж., Петрова, Д., Жипонова, М., Чанева, Г., Василева, Ив., Тошкова-Йотова, Т., Пиларски, П. **(2022).** Перспективни видове еукариотни и прокариотни микроводорасли. 130 години университетски ботанически градини, 21 Юни, София, България
3. **Karcheva, Z.**, Georgieva, Zh., Tomov, A., Petrova, D., Zhiponova, M., Chaneva, G., **(2021).** “Heavy metal stress response of microalgal strains *Arthronema africanum* and *Coelastrella* sp. BGV.” (oral presentation) 28(P01-02). International Seminar of Ecology – 2021, 29/09-30/09 2021, IBER, BAS, Sofia, Bulgaria

Други участия в научни форуми и конференции – непрякосвързани с дисертационния труд

- Mantovska, D., Georgieva, Zh., **Karcheva, Z.,** Rogova, M., Kapchina-Toteva, V., Raycheva, A., Yordanova, Zh., Chaneva, G., Zhiponova, M. **(2022).** "Does the *Drosera rotundifolia* well-being depends on gibberllin and auxin?" International seminar of ecology 2022: Actual problems in Ecology, *poster session,* 29-30 September 2022, IBER, BAS, Sofia, Bulgaria **Трета награда за най-добре представен постер**
- **Karcheva, Z.,** Georgieva, Zh., Zhiponova, M. Petrova, D., Chaneva, G. **(2023).** "Effect of arsenate toxicity on the cyanoprokaryote *Artronema africanum."* International conference Kliment's days. 9-11 November 2023, Sofia, Bulgaria
- **Karcheva, Z.,** Georgieva, Zh., Petrova, D., Zhiponova, M., Chaneva, G., Toshkova-Yotova, T. **(2023).** "Phycoremediation alleviates arsenate toxicity in maize plants.", International conference "Clean nature for healt", 10-13 September, Velingrad, Bulgaria
- **Karcheva, Z.,** Georgieva, Zh., Vladimirova, V., Tomov, Al., Petrova, D., Zhiponova, M., Chaneva, G. **(2022).** "Microalgal response against arsenite toxicity." (oral presentation). International seminar of ecology 2022:- Actual problems in Ecology, *poster session,* 28-29 September 2022, IBER, BAS, Sofia, Bulgaria

БИБЛИОГРАФИЯ:

1. Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. In *Methods in Enzymology* (Vol. 105, pp. 121–126). Elsevier. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3

2. Ahad, R. I. A., & Syiem, M. B. (2019). Influence of calcium on cadmium uptake and toxicity to the cyanobacterium Nostoc muscorum Meg 1. *Biotechnology Research and Innovation*, *3*(2), 231–241. https://doi.org/10.1016/j.biori.2019.06.002

3. Ajayan, K. V., Selvaraju, M., Unnikannan, P., & Sruthi, P. (2015). Phycoremediation of Tannery Wastewater Using Microalgae *Scenedesmus* Species. *International Journal of Phytoremediation*, *17*(10), 907–916. https://doi.org/10.1080/15226514.2014.989313

4. Al-Hasawi, Z. M., Abdel-Hamid, M. I., Almutairi, A. W., & Touliabah, H. E. (2020). Response of Pseudokirchneriella subcapitata in Free and Alginate Immobilized Cells to Heavy Metals Toxicity. *Molecules*, *25*(12), 2847. https://doi.org/10.3390/molecules25122847

5. Allen, M. B., & Arnon, D. I. (1955). Studies on Nitrogen-Fixing Blue-Green Algae. I. Growth and Nitrogen Fixation by Anabaena Cylindrica Lemm. *Plant Physiology*, *30*(4), 366–372. https://doi.org/10.1104/pp.30.4.366

6. Andrejić, G., Gajić, G., Prica, M., Dželetović, Ž., & Rakić, T. (2018). Zinc accumulation, photosynthetic gas exchange, and chlorophyll a fluorescence in Zn-stressed Miscanthus × giganteus plants. *Photosynthetica*, *56*(4), 1249–1258. https://doi.org/10.1007/s11099-018-0827-3

7. Anjum, N. A., Singh, H. P., Khan, M. I. R., Masood, A., Per, T. S., Negi, A., Batish, D. R., Khan, N. A., Duarte, A. C., Pereira, E., & Ahmad, I. (2015). Too much is bad—An appraisal of phytotoxicity of elevated plant-beneficial heavy metal ions. *Environmental Science and Pollution Research*, *22*(5), 3361–3382. https://doi.org/10.1007/s11356-014-3849-9

8. Arunakumara, K. K. I. U., & Zhang, X. (2019). Effect of Pb2+ on phycobiliprotein content of spirulina platensis, an edible cyanobacterium. *Tropical Sgricultural Research*, *19*, 150–159.

9. Audet, P., & Charest, C. (2006). Effects of AM colonization on “wild tobacco” plants grown in zinc-contaminated soil. *Mycorrhiza*, *16*(4), 277–283. https://doi.org/10.1007/s00572-006-0045-x

10. Awasthi, M., & Rai, L. C. (2005). Toxicity of nickel, zinc, and cadmium to nitrate uptake in free and immobilized cells of Scenedesmus quadricauda. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *61*(2), 268–272. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.12.018

11. Barra, L., & Greco, S. (2023). The potential of microalgae in phycoremediation. In S. Aydin (Ed.), *Microalgae—Current and Potential Applications*. IntechOpen. https://doi.org/10.5772/intechopen.1003212

12. Beauchamp, C., & Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, *44*(1), 276–287. https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8

13. Broadley, M. R., White, P. J., Hammond, J. P., Zelko, I., & Lux, A. (2007). Zinc in plants. *New Phytologist*, *173*(4), 677–702. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.01996.x

14. Carfagna, S., Lanza, N., Salbitani, G., Basile, A., Sorbo, S., & Vona, V. (2013). Physiological and morphological responses of Lead or Cadmium exposed Chlorella sorokiniana 211-8K (Chlorophyceae). *SpringerPlus*, *2*(1), 147. https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-147

15. Chaneva, G., Furnadzhieva, S., Minkova, K., & Lukavsky, J. (2007). Effect of light and temperature on the cyanobacterium Arthronema africanum—A prospective phycobiliprotein-producing strain. *Journal of Applied Phycology*, *19*(5), 537–544. https://doi.org/10.1007/s10811-007-9167-6

16. Chaneva, G., Petrova, D., & Uzunova, A. (2009). Changes in Antioxidative Enzymes of a Cyanobacterium Grown Under Heavy Metal Stress. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, *23*(sup1), 554–556. https://doi.org/10.1080/13102818.2009.10818485

17. Chokshi, K., Pancha, I., Ghosh, A., & Mishra, S. (2017). Oxidative Stress-Induced Bioprospecting of Microalgae. In M. Kumar & P. Ralph (Eds.), *Systems Biology of Marine Ecosystems* (pp. 251–276). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-62094-7_13

18. Cirulis, J. T., Scott, J. A., & Ross, G. M. (2013). Management of oxidative stress by microalgae. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, *91*(1), 15–21. https://doi.org/10.1139/cjpp-2012-0249

19. Das, S., Giri, S., Jose, S. A., Pulimi, M., Anand, S., Chandrasekaran, N., Rai, P. K., & Mukherjee, A. (2023). Comparative toxicity assessment of individual, binary and ternary mixtures of SiO2, Fe3O4, and ZnO nanoparticles in freshwater microalgae, Scenedesmus obliquus: Exploring the role of dissolved ions. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, *273*, 109718. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2023.109718

20. Dhindsa, R. S., Plumb-Dhindsa, P., & Thorpe, T. A. (1981). Leaf Senescence: Correlated with Increased Levels of Membrane Permeability and Lipid Peroxidation, and Decreased Levels of Superoxide Dismutase and Catalase. *Journal of Experimental Botany*, *32*(1), 93–101. https://doi.org/10.1093/jxb/32.1.93

21. Dinesh, K. S., P., S., S., A., A. Shenbaga Devi, R., N., B., B. P., S., J., T., J., & P., A. (2014). Effect of different dosages of zinc on the growth and biomass in five marine microalgae. *International Journal of Fisheries and Aquaculture*, *6*(1), 1–8. https://doi.org/10.5897/IJFA2013.0393

22. El-Agawany, N. I., & Kaamoush, M. I. A. (2022). Role of zinc as an essential microelement for algal growth and concerns about its potential environmental risks. *Environmental Science and Pollution Research*, *30*(28), 71900–71911. https://doi.org/10.1007/s11356-022-20536-z

23. Fatemi, H., Zaghdoud, C., Nortes, P. A., Carvajal, M., & Martínez-Ballesta, M. D. C. (2020). Differential Aquaporin Response to Distinct Effects of Two Zn Concentrations after Foliar Application in Pak Choi (Brassica rapa L.) Plants. *Agronomy*, *10*(3), 450. https://doi.org/10.3390/agronomy10030450

24. Gao, K., Ji, Y., & Tanaka, J. (2004). Quantitative evaluation of wind effect during emersion on Porhpyra haitanensis (Rhodophyta), a farmed species in southern China. *Fisheries Science*, *70*(4), 710–712. https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2004.00861.x

25. Gaur, N., & Dhankhar, R. (2009). *Removal of Zn+ 2 ions from aqueous solution using Anabaena variabilis: Equilibrium and kinetic studies. 3*(4), 605–616.

26. Gauthier, M. R., Senhorinho, G. N. A., & Scott, J. A. (2020). Microalgae under environmental stress as a source of antioxidants. *Algal Research*, *52*, 102104. https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102104

27. Georgiev, D., Dilov, C., & Avramova, S. (1978). Buffer nutrient medium and a method for intensive cultivation of green microalgae. *Hydrobiologia*, *7*, 14–24.

28. Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, *48*(12), 909–930. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016

29. Goswami, S., Diengdoh, O. L., Syiem, M. B., Pakshirajan, K., & Kiran, M. G. (2015). Zn(II) and Cu(II) removal by *Nostoc muscorum*: A cyanobacterium isolated from a coal mining pit in Chiehruphi, Meghalaya, India. *Canadian Journal of Microbiology*, *61*(3), 209–215. https://doi.org/10.1139/cjm-2014-0599

30. Han, T.-W., Tseng, C.-C., Cai, M., Chen, K., Cheng, S.-Y., & Wang, J. (2020). Effects of Cadmium on Bioaccumulation, Bioabsorption, and Photosynthesis in Sarcodia suiae. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *17*(4), 1294. https://doi.org/10.3390/ijerph17041294

31. Hart, R., Mackay, J. M. K., McVittie, C. R., & Mellor, D. J. (1971). A Technique for the Derivation of Lambs by Hysterectomy. *British Veterinary Journal*, *127*(9), 419–424. https://doi.org/10.1016/S0007-1935(17)37386-4

32. Hmani, R. (2024). *Heavy metals removal by the microalgae Chlorococcum*. In Review. https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-4433154/v2

33. Huang, J. J., Lin, S., Xu, W., & Cheung, P. C. K. (2017). Occurrence and biosynthesis of carotenoids in phytoplankton. *Biotechnology Advances*, *35*(5), 597–618. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.05.001

34. Jessup, A. C. (1944). The Laws of Nature. *Nature*, *154*(3909), 432–432. https://doi.org/10.1038/154432a0

35. Kaewsarn, P. (2002). Biosorption of copper(II) from aqueous solutions by pre-treated biomass of marine algae Padina sp. *Chemosphere*, *47*(10), 1081–1085. https://doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00324-1

36. Karcheva, Z., Georgieva, Z., Tomov, A., Petrova, D., Zhiponova, M., Vasileva, I., & Chaneva, G. (2022). Heavy metal stress response of microalgal strains Arthronema africanum and Coelastrella sp. BGV. *BioRisk*, *17*, 83–94. https://doi.org/10.3897/biorisk.17.77483

37. Karna, R. R., Uma, L., Subramanian, G., & Mohan, P. M. (1999). Biosorption of toxic metal ions by alkali-extracted biomass of a marine cyanobacterium, Phormidium valderianum BDU 30501. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *15*(6), 729–732. https://doi.org/10.1023/A:1008992510890

38. Kaur, H., & Garg, N. (2021). Zinc toxicity in plants: A review. *Planta*, *253*(6), 129. https://doi.org/10.1007/s00425-021-03642-z

39. Khudsar, T., Mahmooduzzafar, M., Iqbal, M., & Sairam, R. K. (2004). Zinc-Induced Changes in Morpho-Physiological and Biochemical Parameters in Artemisia annua. *Biologia Plantarum*, *48*(2), 255–260. https://doi.org/10.1023/B:BIOP.0000033453.24705.f5

40. King, P., Rakesh, N., Beenalahari, S., Prasanna Kumar, Y., & Prasad, V. S. R. K. (2007). Removal of lead from aqueous solution using Syzygium cumini L.: Equilibrium and kinetic studies. *Journal of Hazardous Materials*, *142*(1–2), 340–347. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.08.027

41. Klimmek, S., Stan, H.-J., Wilke, A., Bunke, G., & Buchholz, R. (2001). Comparative Analysis of the Biosorption of Cadmium, Lead, Nickel, and Zinc by Algae. *Environmental Science & Technology*, *35*(21), 4283–4288. https://doi.org/10.1021/es010063x

42. Komárek, J., & Lukavský, J. (1988). Arthronema, a new cyanophyte genus from Afro-Asian deserts. *Arch. Hydrobiol. Suppl.*, *80*(1–4), 249–267.

43. Kong, W., Xu, Q., Lyu, H., Kong, J., Wang, X., Shen, B., & Bi, Y. (2023). Sediment and residual feed from aquaculture water bodies threaten aquatic environmental ecosystem: Interactions among algae, heavy metals, and nutrients. *Journal of Environmental Management*, *326*, 116735. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.116735

44. Li, H., Cheng, K., Wong, C., Fan, K., Chen, F., & Jiang, Y. (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry*, *102*(3), 771–776. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.022

45. Long, X. X., Yang, X. E., Ni, W. Z., Ye, Z. Q., He, Z. L., Calvert, D. V., & Stoffella, J. P. (2003). Assessing Zinc Thresholds for Phytotoxicity and Potential Dietary Toxicity in Selected Vegetable Crops. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, *34*(9–10), 1421–1434. https://doi.org/10.1081/CSS-120020454

46. López-Hernández, J. F., García-Alamilla, P., Palma-Ramírez, D., Álvarez-González, C. A., Paredes-Rojas, J. C., & Márquez-Rocha, F. J. (2020). Continuous Microalgal Cultivation for Antioxidants Production. *Molecules*, *25*(18), 4171. https://doi.org/10.3390/molecules25184171

47. Lordan, S., Ross, R. P., & Stanton, C. (2011). Marine Bioactives as Functional Food Ingredients: Potential to Reduce the Incidence of Chronic Diseases. *Marine Drugs*, *9*(6), 1056–1100. https://doi.org/10.3390/md9061056

48. Lowry, OliverH., Rosebrough, NiraJ., Farr, A. L., & Randall, RoseJ. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, *193*(1), 265–275. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6

49. Mackinney, G. (1940). Criteria for purity of chlorophyll preparations. *Journal of Biological Chemistry*, *132*(1), 91–109. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)73399-1

50. Malletzidou, L., Kyratzopoulou, E., Kyzaki, N., Nerantzis, E., & Kazakis, N. A. (2025). Towards the Sustainable Removal of Heavy Metals from Wastewater Using Arthrospira platensis: A Laboratory-Scale Approach in the Context of a Green Circular Economy. *Applied Sciences*, *15*(2), 791. https://doi.org/10.3390/app15020791

51. Marinova, G., Ivanova, J., Pilarski, P., Chernev, G., & Chaneva, G. (2018). Effect of heavy metals on the green alga Scenedesmus incrassatulus. *Oxidation Communications*, *41*(2), 318–328.

52. Mathimani, T., Rene, E. R., Devanesan, S., & AlSalhi, M. S. (2023). Removal of zinc by Selenastrum sp. And simultaneous biodiesel production from metal-resistant biomass for energy and environmental sustainability. *Algal Research*, *73*, 103157. https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103157

53. Milieu Ltd., RPA, & WRc. (2010). *Environmental, Economic and Social Impacts of the Use of Sewage Sludge on Land—Consultation Report on Options and Impacts.* 1–32.

54. Misra, A., Srivastava, A. K., Srivastava, N. K., & Khan, A. (2005). Zn-acquisition and its role in growth, photosynthesis, photosynthetic pigments, and biochemical changes in essential monoterpene oil(s) of Pelargonium graveolens. *Photosynthetica*, *43*(1), 153–155. https://doi.org/10.1007/s11099-005-3155-3

55. Nawaz, A., Molnárová, M., Šotek, P. E., & Fargašová, A. (2024). Toxicity assessment of Cd and Cu on physicochemical parameters of green microalga Scenedesmus quadricauda. *Journal of Applied Phycology*. https://doi.org/10.1007/s10811-024-03380-1

56. Pham, T.-L., Dao, T.-S., Bui, H., Pham, T., Ngo, T., & Bui, H. (2020). Lipid Production Combined with Removaland Bioaccumulation of Pb by Scenedesmus sp.Green Alga. *Polish Journal of Environmental Studies*, *29*(2), 1785–1791. https://doi.org/10.15244/pjoes/109277

57. Pinto, E., Sigaud-kutner, T. C. S., Leitão, M. A. S., Okamoto, O. K., Morse, D., & Colepicolo, P. (2003). Heavy metal–induced oxidative stress in algae. *Journal of Phycology*, *39*(6), 1008–1018. https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.2003.02-193.x

58. Qiu, C., Wang, W., Zhang, Y., Zhou, G.-J., & Bi, Y. (2022). Response of Antioxidant Enzyme Activities of the Green Microalga Chlorococcum sp. AZHB to Cu2+ and Cd2+ Stress. *Sustainability*, *14*(16), 10320. https://doi.org/10.3390/su141610320

59. Rai, U. N., Singh, N. K., Upadhyay, A. K., & Verma, S. (2013). Chromate tolerance and accumulation in Chlorella vulgaris L.:

Role of antioxidant enzymes and biochemical changes in detoxification of metals. *Bioresource Technology*, *136*, 604–609. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.043

60. Rebolloso Fuentes, M. (2000). Biomass nutrient profiles of the microalga Porphyridium cruentum. *Food Chemistry*, *70*(3), 345–353. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00101-1

61. Rezayian, M., Niknam, V., & Ebrahimzadeh, H. (2019). Oxidative damage and antioxidative system in algae. *Toxicology Reports*, *6*, 1309–1313. https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.10.001

62. Romero-Cruz, M. D. C., Leon-Vaz, A., Giráldez, I., Vega, J. M., & Vigara, J. (2024). Effect of heavy metals on the antioxidant system of the acid-tolerant microalga Coccomyxa onubensis. *Algal Research*, *77*, 103337. https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103337

63. Rout, G. R., & Das, P. (2009). Effect of Metal Toxicity on Plant Growth and Metabolism: I. Zinc. In E. Lichtfouse, M. Navarrete, P. Debaeke, S. Véronique, & C. Alberola (Eds.), *Sustainable Agriculture* (pp. 873–884). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-90-481-2666-8_53

64. Rudi, L., Cepoi, L., Chiriac, T., & Djur, S. (2024). Interactions Between Potentially Toxic Nanoparticles (Cu, CuO, ZnO, and TiO2) and the Cyanobacterium Arthrospira platensis: Biological Adaptations to Xenobiotics. *Nanomaterials*, *15*(1), 46. https://doi.org/10.3390/nano15010046

65. Sabatini, S. E., Juárez, Á. B., Eppis, M. R., Bianchi, L., Luquet, C. M., & Ríos De Molina, M. D. C. (2009). Oxidative stress and antioxidant defenses in two green microalgae exposed to copper. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *72*(4), 1200–1206. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.01.003

66. Saed-Moucheshi, A., Shekoofa, A., & Pessarakli, M. (2014). Reactive Oxygen Species (ROS) Generation and Detoxifying in Plants. *Journal of Plant Nutrition*, *37*(10), 1573–1585. https://doi.org/10.1080/01904167.2013.868483

67. Santiago-Morales, I. S., Trujillo-Valle, L., Márquez-Rocha, F. J., & López Hernández, J. F. (2018). Tocopherols, Phycocyanin and Superoxide Dismutase from Microalgae: As Potential Food Antioxidants. *Applied Food Biotechnology*, *5*(1). https://doi.org/10.22037/afb.v5i1.17884

68. Santos, F. M., Mazur, L. P., Mayer, D. A., Vilar, V. J. P., & Pires, J. C. M. (2019). Inhibition effect of zinc, cadmium, and nickel ions in microalgal growth and nutrient uptake from water: An experimental approach. *Chemical Engineering Journal*, *366*, 358–367. https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.02.080

69. Šetlik, I. (1966). *Contamination of algal cultures by heterotrophic microorganisms and its prevention*. 89–100.

70. Shen, L., Chen, R., Wang, J., Fan, L., Cui, L., Zhang, Y., Cheng, J., Wu, X., Li, J., & Zeng, W. (2021). Biosorption behavior and mechanism of cadmium from aqueous solutions by *Synechocystis* sp. PCC6803. *RSC Advances*, *11*(30), 18637–18650. https://doi.org/10.1039/D1RA02366G

71. Song, X., Kong, F., Liu, B.-F., Song, Q., Ren, N.-Q., & Ren, H.-Y. (2024). Lipidomics analysis of microalgal lipid production and heavy metal adsorption under glycine betaine-mediated alleviation of low-temperature stress. *Journal of Hazardous Materials*, *480*, 135831. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2024.135831

72. Soto, P., Gaete, H., & Hidalgo, M. E. (2011). Assessment of catalase activity, lipid peroxidation, chlorophyll a, and growth rate in the freshwater green algae Pseudokirchneriella subcapitata exposed to copper and zinc. *Latin American Journal of Aquatic Research*, *39*(2), 280–285. https://doi.org/10.3856/vol39-issue2-fulltext-9

73. Staub, R. (1961). Ernährungsphysiologisch-autökologische Untersuchungen an der planktischen BlaualgeOscillatoria rubescens DC. *Schweizerische Zeitschrift für Hydrologie*, *23*(1), 82–198. https://doi.org/10.1007/BF02505618

74. Suresh Kumar, K., Dahms, H.-U., Won, E.-J., Lee, J.-S., & Shin, K.-H. (2015). Microalgae – A promising tool for heavy metal remediation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *113*, 329–352. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.12.019

75. Tan, S., Wen, F., Liu, D., Lu, H., Li, L., & Zhu, L. (2024). Physiological responses and lipid accumulation of freshwater microalgae Chlorella sorokiniana under short-term zinc stress in water solution. *Algal Research*, *80*, 103528. https://doi.org/10.1016/j.algal.2024.103528

76. Vaillant, N., Monnet, F., Hitmi, A., Sallanon, H., & Coudret, A. (2005). Comparative study of responses in four Datura species to a zinc stress. *Chemosphere*, *59*(7), 1005–1013. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.11.030

77. Vanerkar, A. P., Fulke, A. B., Lokhande, S. K., Giripunje, M. D., & Satyanarayan, S. (2015). Recycling and treatment of herbal pharmaceutical wastewater using Scenedesmus quadricuada. *Current Science*, *108*(5), 979–983.

78. Wang, J., Tian, Q., Zhou, H., Kang, J., Yu, X., Qiu, G., & Shen, L. (2024). Physiological regulation of microalgae under cadmium stress and response mechanisms of time-series analysis using metabolomics. *Science of The Total Environment*, *916*, 170278. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.170278

79. Wu, D.-T., Li, W.-X., Wan, J.-J., Hu, Y.-C., Gan, R.-Y., & Zou, L. (2023). A Comprehensive Review of Pea (Pisum sativum L.): Chemical Composition, Processing, Health Benefits, and Food Applications. *Foods*, *12*(13), 2527. https://doi.org/10.3390/foods12132527

80. Xu, Y., Shui, X., Gao, M., Zhang, Y., Zhang, Z., Zhu, Z., Zhao, B., & Sun, D. (2024). Toxicological effects and mechanisms of lithium on growth, photosynthesis and antioxidant system in the freshwater microalga Chromochloris zofingiensis. *Journal of Hazardous Materials*, *469*, 133898. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2024.133898

81. Zeng, Y., Chen, X., Zhu, J., Long, D., Jian, Y., Tan, Q., & Wang, H. (2024). Effects of Cu (II) on the Growth of Chlorella vulgaris and Its Removal Efficiency of Pollutants in Synthetic Piggery Digestate. *Toxics*, *12*(1), 56. https://doi.org/10.3390/toxics12010056

82. Zhang, L., Wang, J., Shao, R., Chuai, X., Wang, S., & Yue, Z. (2024). Detoxification and removal of heavy metal by an acid-tolerant microalgae, Graesiella sp. MA1. *Journal of Water Process Engineering*, *64*, 105579. https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2024.105579

83. Zhang, Y., Wang, X., Shan, T., Pang, S., & Xu, N. (2019). Transcriptome profiling of the meristem tissue of Saccharina japonica (Phaeophyceae, Laminariales) under severe stress of copper. *Marine Genomics*, *47*, 100671. https://doi.org/10.1016/j.margen.2019.03.006

84. Zhou, G.-J., Peng, F.-Q., Zhang, L.-J., & Ying, G.-G. (2012). Biosorption of zinc and copper from aqueous solutions by two freshwater green microalgae Chlorella pyrenoidosa and Scenedesmus obliquus. *Environmental Science and Pollution Research*, *19*(7), 2918–2929. https://doi.org/10.1007/s11356-012-0800-9

85. Zhou, T., Li, X., Zhang, Q., Dong, S., Liu, H., Liu, Y., Chaves, A. V., Ralph, P. J., Ruan, R., & Wang, Q. (2022). Ecotoxicological response of Spirulina platensis to coexisted copper and zinc in anaerobic digestion effluent. *Science of The Total Environment*, *837*, 155874. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155874

86. Zhou, T., Wang, J., Zheng, H., Wu, X., Wang, Y., Liu, M., Xiang, S., Cao, L., Ruan, R., & Liu, Y. (2018). Characterization of additional zinc ions on the growth, biochemical composition and photosynthetic performance from Spirulina platensis. *Bioresource Technology*, *269*, 285–291. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.08.131