



АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация за присъждане на
образователната и научна степен „доктор“
Професионално направление 4.3 Биологични науки
Научна специалност “Микробиология”

МИЛЕНА НИКОЛОВА ПЕТРОВА

**Разработване на биологичноактивни продукти
от нови природни източници**

Научни ръководители: проф. д-р Петя Христова

доц. д-р Ганка Чанева

Дисертационният труд съдържа 160 страници текст във формат А4, 41 таблици и 26 фигури. Приложенията са 21 страници, съдържащи 12 таблици и 28 фигури. Използваната литература включва 477 заглавия.

Експерименталната работа е извършена в катедра „Обща и промишлена микробиология,, към Биологически факултет на Софийски университет „Св. Климент Охридски“, лаборатория „Експериментална алгология“ на Институт по физиология на растенията и генетика към Българска академия на науките и Агробиоинститут към Селскостопанска академия.

Дисертационният труд е обсъден на разширено заседание на катедра „Обща и промишлена микробиология“ към Биологически факултет на Софийски университет „Св. Климент Охридски“, проведено на 28.06.2022 г. (протокол №160). Насрочената защита със заповед № РД на ректора на Софийски университет „Св. Климент Охридски“ е с научно жури в състав:

1. проф. д-р Пенка Ангелова Мончева – СУ „Св. Климент Охридски“
2. проф. д-р Светлана Трифонова Данова – Институт по микробиология, БАН
3. доц. д-р Мирослава Константинова Жипонова – СУ „Св. Климент Охридски“
4. доц. д-р Адриана Георгиева Гущерова – Институт по микробиология, БАН
5. доц. д-р Пламен Стойнев Пиларски, ИФРГ, БАН

За официални рецензенти са определени:

.....
.....

Защитата на дисертацията ще се проведе на от часа в сградата на Биологически факултет на Софийски университет „Св. Климент Охридски“.

Материалите по защитата се намират на сайта на Биологически факултет и в катедра по „Обща и промишлена микробиология“.



АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация за присъждане на
образователната и научна степен „доктор“
Професионално направление 4.3 Биологични науки
Научна специалност “Микробиология”

МИЛЕНА НИКОЛОВА ПЕТРОВА

**Разработване на биологичноактивни продукти
от нови природни източници**

Научни ръководители: проф. д-р Петя Христова

доц. д-р Ганка Чанева

София, 2022

УВОД

Микробните и вирусните инфекции водят както до проблеми с общественото здраве, така и до икономически значими загуби (напр. когато засягат земеделски култури и съответно хранителната промишленост). Затова борбата срещу тях е едно от големите предизвикателства пред научната общност. Според План за дейността на Национален референтен център „Инфекции, предавани с храни и води“ (НРЦ-ИПХВ) от 2021 г., „инфекциозните заболявания, предавани с храни и води, са световен здравен проблем и по честота са на второ място след респираторните инфекции“. В документа се отбелязва, че най-често заболяванията на стомашно-чревния тракт „се предават по орален път чрез консумация на контаминирани храни“.

Към този момент човечеството притежава ограничен брой лекарствени средства за системно приложение. Основен проблем е появата на шамове, които са резистентни към един или повече от използваните антибиотични лекарства и други медикаменти. Справянето с резистентни бактериални шамове води до необходимост от търсене на нови лекарствени продукти (Newman et al., 2003; Koehn and Carter, 2005). Една от причините за възникването на резистентни бактерии е неконтролируемото използване на антибиотици не само за лечение на хора, но също така във ветеринарната практика и в земеделието. Така попадането и влагането на лекарства в хранителни продукти може да има последици върху човешкото здраве. Затова въпреки, че проблемите с живота и здравето на хората винаги е от първостепенно значение, учените по цял свят обръщат не по-малко внимание и върху проблемите свързани с качеството на храните.

Намаляването или дори загубата на добив на селскостопанската продукция, често се дължи на различни причини. Една от тях е липсата на достатъчно ефективна защита на растенията от болести, причинявани от фитопатогенни бактерии, наречени „бактериози“. Пестицидите са едно от основните средства за борба с вредителите в земеделието, но основен недостатък на използването им е това, че влияят неблагоприятно върху околната среда и прекомерната им употреба може да крие риск за здравето на животни и хора. Така напр. сярата и сероваровият разтвор са най-често използваните за борба срещу струпяването при ябълката, но те са фитотоксични за растенията и въпреки, че не са канцерогенни, могат да предизвикат респираторни проблеми при хора. Някои учени твърдят, че в резултат на продължително въздействие

на тези продукти са се увеличили заболявания като Паркинсон (Bonetta, 2002; Freire and Koifman, 2012), диабет тип 2, някои видове рак (Jungmann, 1966; Roth, 1958), ендокринни нарушения, невротоксичност, астма (Hernández et al., 2011) и дори затлъстявания (Thayer et al., 2012). Според EPA 2010 повече от 70 пестицида са класифицирани като потенциално канцерогенни. Канцерогенното действие на пестицидите е дискутирано подробно от Mostafalou and Abdollahi (2013). Околната среда също е засегната от използването на синтетични пестициди, които се натрупват в почвата и замърсяват подпочвените води (Rashid et al., 2010; Harizanova-Bartos and Stoyanova, 2019; Terziev and Petkova-Georgieva, 2020; Tamm et al., 2022).

В момента по света се наблюдават множество тревожни тенденции - значителното увеличаване на замърсяването с пестициди, от една страна, и появата на все по-резистентни бактериални щамове предизвикващи инфекции, от друга. Към това може да се прибави и опасността от кръстосаните патогени – човешки патогени, които се интегрират в растителен или животински микробиом (Van Baarlen et al., 2007; Христова, 2020). Бактериите, които контаминират храната, заразяват хората и причиняват хранителни болести като например диария (Shannon and Abu-Ghannam, 2016). Заразените храни включват бактерии и бактериални спори, микроскопични гъби, вируси, дрожди и др.

Може да се твърди, че нарастващата резистентност на вредните бактерии увеличава и нуждата от увеличение на употребата на пестициди. Тази зависимост е много тревожна и е напълно възможно да се достигне до много неприятни последици за земеделието. Затова в последните години се увеличи значително интересът към проучванията на биологични ефекти на природни съединения срещу бактериални и/или гъбични инфекции.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на дисертационния труд е изследване и оценка на антиоксидантната и антимикробната активност на биоактивни вещества от нови природни източници - продукти от микроводорасли и безгръбначни (хемоцианин).

За реализиране на целта на дисертацията са поставени следните **задачи**:

1. Изолране, идентификация и лабораторно култивиране на перспективни щамове микроводорасли;
2. Получаване на екстракти и полизахариди от избрани микроводораслови щамове;
3. Определяне на антиоксидантната активност на микроводораслови продукти;
4. Определяне на антимикробната активност на микроводорасловите екстракти и полизахариди срещу човешки и растителни патогени;
5. Изследване на антимикробната активност на комбинация от екстракти от микроводорасли;
6. Определяне на антимикробната активност на природни антибиотици по отношение на фитопатогени;
7. Определяне на антимикробната активност на хемоцианин по отношение на човешки патогени.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Материали

В дисертацията са използвани три различни вида микроводорасли - цианобактериите *Arhtronema africanum* Lukavský 1981/01, *Nostoc commune* Vaucher и изолат от хлорелоподобно микроводорасло (*XПВ-А1*).

A. africanum Lukavský 1981/01 е предоставена от д-р Яромир Лукавски от Институт по Ботаника в Чешката академия на науките. В България се съхранява в колекцията на Лаборатория „Експериментална алгология“ на ИФРГ към БАН в хранителна среда Zehnder (Staub, 1961) при постоянно осветяване с луминесцентни лампи (2000 lx) в 100 ml ерленмайерови колби.

N. commune Vaucher е изолиран от природна проба от скална повърхност в района на Рупите, събрана от доц. д-р Пламен Пиларски през м. април 2019 г. Процедурата по пречистването на пробата е извършена от нас съвместно с докторант Тая Тошкова-Йотова от лаборатория „Експериментална алгология“ на ИФРГ към БАН. Щамът е идентифициран таксономично като *N. commune* Vaucher ex Bornet et Flahault, 1888, от доц. д-р Детелина Белкинова от ИБЕР, БАН.

Третият щам (*XПВ-А1*) се отнася към зелените микроводорасли и е отнесен към групата на хлорелоподобните микроводорасли. Той е изолиран в Катедрата по “Обща и промишлена микробиология” и идентифициран с научната помощ на доц. Благой Узунов от Катедрата по “Ботаника” на Биологически факултет към Софийски университет и гл. ас. д-р Катя Стефанова от Агробиоинститут (АБИ) към Селскостопанска академия, София.

За определяне на антимикробната активност в дисертационния труд са използвани следните шамове тест-микроорганизми:

Изолати от хранителни продукти: *Escherichia coli*, *Bacillus* sp., *Listeria* sp., *Enterococcus* sp., *Staphylococcus* sp.; Щам, изолиран от замърсени води: *Pseudomonas aeruginosa*; Щамове на 4 вида фитопатогенни бактерии: *Xanthomonas gardneri* 62t, *Xanthomonas gardneri* 64t, *Xanthomonas euvesicatoria* 105d, *Xanthomonas euvesicatoria* 269p, *Xanthomonas vesicatoria* 68t, *Xanthomonas vesicatoria* 60t, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* 32f. Всички шамове са идентифицирани до род или вид и са от колекцията на катедра „Обща и промишлена микробиология“.

Като контроли са използвани следните колекционни микроорганизми:

Човешки патогени: Грам-положителни бактерии: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* НБПМКК 3486, *Staphylococcus epidermidis* НБПМКК 1093, *Enterococcus faecalis* НБПМКК 3915, *Bacillus subtilis* НБПМКК 3562, *Bacillus cereus* НБПМКК 1085, *Listeria innocua* НБПМКК 8755, *Propionibacterium acnes* PA266; Грам-отрицателни бактерии: *Escherichia coli* ATCC 25923, *Escherichia coli* УРЕС НБПМКК 8954, *Escherichia coli* ЕРЕС клиничен изолат, *Escherichia coli* НБПМКК 3397, *Salmonella typhimurium* НБПМКК 3669, *Salmonella enterica* НБПМКК 8691, *Proteus mirabilis* НБПМКК 8747, *Pseudomonas aeruginosa* НБПМКК 3700, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* НБПМКК 3670; Дрожди: *Cryptococcus neoformans*, *Candida glabrata* НБПМКК 8656 (ATCC 2001), *Candida albicans* НБПМКК 74 (ATCC 10231).

Фитопатогенни бактерии: Грам-отрицателни - *Xanthomonas gardneri* НБПМКК 8730, *Xanthomonas euvesicatoria* НБПМКК 8731, *Xanthomonas vesicatoria* НБПМКК 2427, *Xanthomonas perforans* НБПМКК 8729, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* НБПМКК 3374, *Burkholderia gladioli* pv. *alliiicola* НБПМКК 8616, *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli* НБПМКК 8569, *Erwinia amylovora* НБПМКК 8492; Грам-положителни: *Clavibacter michiganensis* НБПМКК 2425.

За култивиране на *A. africanum* е използвана хранителна, съгласно Allen and Arnon (1955) и Zehnder (Staub, 1961), модифицирана от Chaneva et al. (2007). За получаване на обогатена култура от хлорелоподобното микроводорасло и за култивиране на *N. commune* е използвана среда BG11, описана за първи път от Hughes (1958), модифицирана от Allen (1968).

2. Методи

Култивирането на *A. africanum* се извършва при стерилни условия и използване на съоръженията, описани от Дилов (1985). Пречистването на природната проба *N. commune* е направено по методика, описана от Diao and Yang (2014), в модификация на Guillard (2005). За пречистването на *XIV-A1* са направени серийни падащи разреждания в течна хранителна среда BG11, впоследствие култивиран на клатачен апарат и прехвърлен във ферментационни колби.

Културалната среда (КС), получена от микроводорасловата суспензия в стационарна фаза на растеж, се центрофугирана при 5000 грм за 10 min. Отделената супернатанта се лиофилизира и полученият продукт се разтваря в стерилна дестилирана вода в необходимите концентрации.

Екзополизахаридът (ЕкПЗ) се получава чрез утаяване на извънклетъчния екстракт с 96% чист етанол при съотношение 1:2 за 24 ч., след което течността се центрофугира при 5000 грм за 10 min. От супернатантата се изолира ЕПЗ-та фракция чрез утаяване с охладен 96% етанол в съотношение 1:2, за 24 ч. Изолираният извънклетъчен полизахарид се диализира за 24 ч. и се изсушава лиофилно. Полученият продукт се разтваря в етанол, разреден с дестилирана вода, в необходимите концентрации.

Високотемпературният воден екстракт (ВТ) се получава чрез нагриване при висока температура, като се използва методиката, разработена в Лаборатория „Експериментална алгология“ към ИФРГ-БАН.

Нискотемпературният екстракт (НТ) е получен като лиофилно изсушената биомаса се залива с кипяща стерилна дестилирана вода в съотношение 1:10, охлажда се до 40°C и сместа се поставя в хладилник (4°C) за 48 ч. при периодично разбъркване, следва отделяне на клетъчната маса чрез центрофугиране при 5000 грм/10 min., водният екстракт се изсушава лиофилно и полученият лиофилизат се разрежда с дестилирана вода в необходимите концентрации.

Алкохолният екстракт (АЕ) се получава чрез екстракция с 96% етанол и нагриване при 50°C, извлекът се филтрува и изпарява до сухо на ротационен вакуумен изпарител при 60°C и изсушеният продукт се разтваря в DMSO в желаните концентрации.

Ендополизахаридът (ЕнПЗ) се получава като към отделената биомаса се добавя стерилна д. Н₂О и се блендира за 5 мин. Тази смес се центрофугира на 3000 оборота за 10 мин. От супернатантата се извлича ендополизахаридната фракция – чрез утаяване с 96% етанол в съотношение 1:2, за 24 часа. Изолираният ендополизахарид се диализира за 24 часа и се изсушава лиофилно.

Относно **хемоцианина**, хемолимфата е екстрахирана от морски раци *Eriphia verrucosa*, които са събрани в района на Камчия, Черно море. Те са обработени и предоставени от лаборатория „Структурен органичен анализ“ към „Институт по

органична химия с център по фитохимия“, Българска академия на науките. Пробите включват нативен хемоцианин CrH и съответните субединици от него SU1, SU2, SU3, SU4 и SU5.

Определянето на **абсолютно сухо вещество** (ACB) се извършва тегловно, след отстраняване на солите от средата с 11.5% л. CH_3COOH , центрофугиране при 5500 грт, последващо отделяне на супернатантата и изсушаване на биомасата при 105°C до постоянно тегло.

За определяне на **общото съдържание на белтъци** е използван методът на Лоури (Lowry, 1951).

Общото съдържание на въглехидрати във водорасловата биомаса се определя по фенол-серния метод (Dubois et al., 1956).

Липидното съдържание е определено по адаптиран метод на (Петков, 1990).

Съдържанието на пластидни пигменти (хлорофил *a*, хлорофил *b* и каротеноиди) в микроводорасловата проба е определено спектрофотометрично по два метода - чрез екстракция с кипящ метанол и чрез екстракция с ацетон.

Тоталното съдържание на феноли е определено по метода на Singleton et al. (1999).

Тоталното съдържание на флавоноиди се определя по метода на Chang et al. (2002) чрез реакция с AlCl_3 .

DRPН-радикал-улавяща активност на екстрактите се определя по метода на Brand-Williams et al. (1995).

Тоталната антиоксидантна активност е определена по фосфомолибденовия метод (Prieto et al., 1999).

За определяне на **антимикробната активност** са използвани методът на ямки в агар на Rose and Miller (1939), диск-дифузионният метод на Бауер-Кърби (Bauer et. al., 1966), **минимална инхибираща концентрация** по метода на микроразреждане в течна хранителна среда на (Hendriksen and Larsen, 2003), а **минимална бактерицидна концентрация** по метода описан от Sampaio et al. (2009). За определяне на комбинираното действие на екстрактите се използва **фракционна инхибираща концентрация** съгласно (Bharadwaj et al. 2003).

Изолирането на ДНК за *XIPB-A1* е извършено с кит за изолиране на ДНК – Blood -Animal-Plant DNA на фирмата Jana Bioscience. За амплифицирането на 18S

ДНК са използвани следните универсални двойки праймери: ITS1+ ITS2, ITS1+ ITS4, а за хлоропластна ДНК - rbcL-F+ rbcL-R. PCR продуктите са пречистени посредством кит The thermo Scientific GenJetGel Extraction Kit K#0692. Пречистените PCR продукти се изпращат за секвениране в концентрация 53,4 ng/μl.

Секвенирането е осъществено по протокол на фирмата MacroGen (Холандия). Получените секвенции са анализирани с програмите vector NT1 v.10 (Life Technologies), BLASTn (Camacho et al., 2009) и Clustal W.

Относно обработката на резултатите, всички опити са проведени в минимум 3 повторения. Те са представени като средни стойности и стандартни отклонения (\pm SD). Статистически значимата разлика между отделните експерименти е установена чрез еднофакторен дисперсионен анализ (ANOVA). Стойностите на $p \leq 0,05$ са приемани за значими.

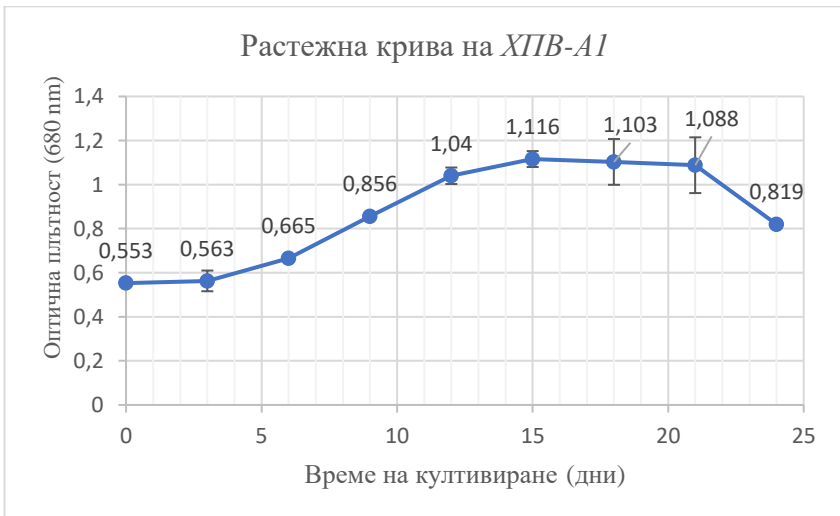
РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Изолиране и култивиране на щамовете

A. africanum е шам предоставен от колекцията на Института по Ботаника, град Требон, Чешка академия на науките. *Nostoc*, който е използван в настоящия дисертационен труд, е изолиран от района на Рупите, Петричко и е природен, т.е не напълно пречистен до алгологично чиста култура. Култивирането на двата шاما е извършено в блок за интензивно култивиране, при подходящи за двата шاما условия.



Фиг. 1. Култивиране на микроводорасловия шам (*XПВ-А1*)

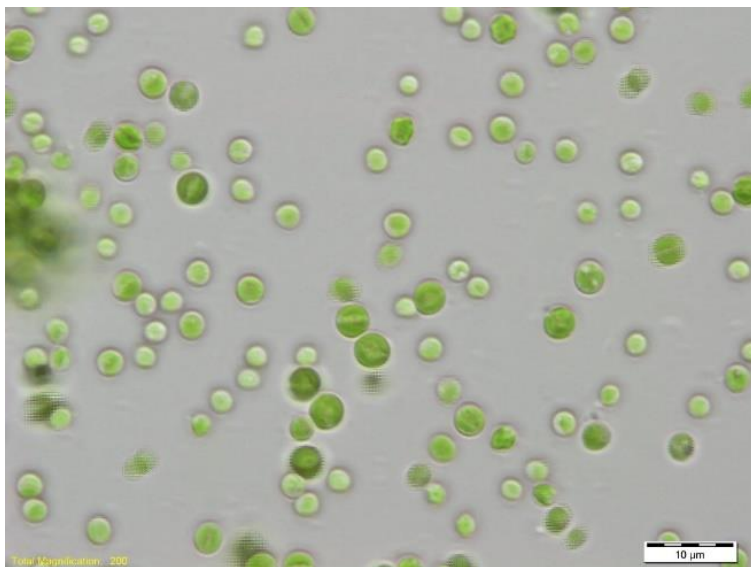


Фиг. 2. Растежна крива на *XПВ-А1*

За изолирането на *XIV-A1* е използвана класическата процедура, при която първо се получава обогатена култура от микроводораслото, а след това се разрежда в течна хранителна среда BG11. Култивирането е извършено в ерленмайлерови колби (Фиг. 1). Растежната крива е показана на Фиг. 2.

2. Идентифициране на щамовете

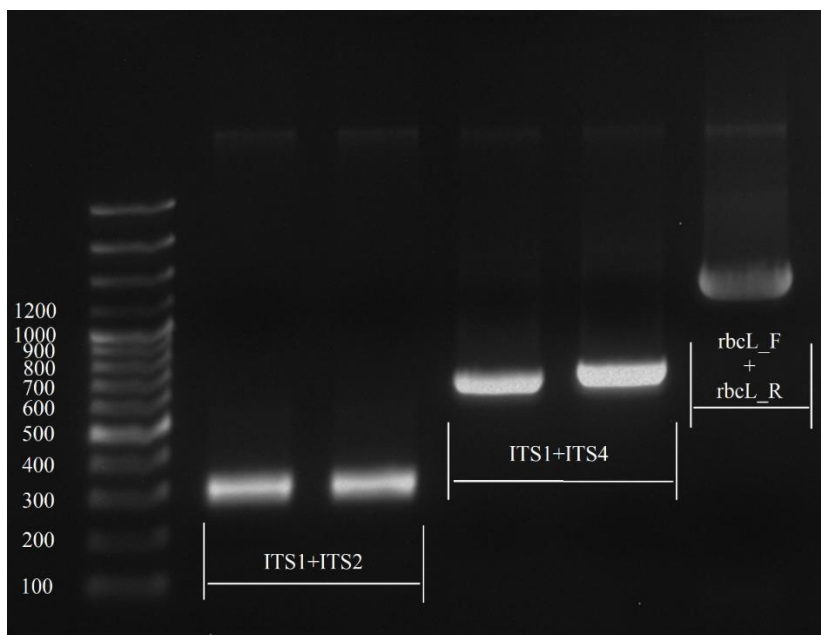
Идентификацията на *Nostoc* е базирана на фенотипни характеристики и е определен от доц. д-р Детелина Белкинова от ИБЕР на Българска Академия на Науките. Щамът е таксономично определен като *N. commune* Vaucher.



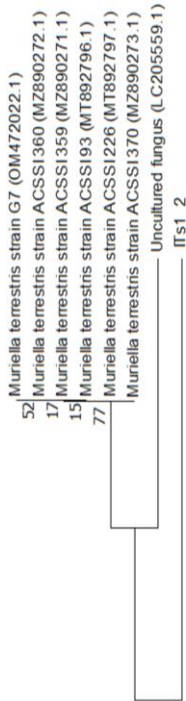
Фиг. 3. Микроскопска снимка на клетки от *XIV-A1*, 40 x (Olympus DP72)

XIV-A1 е изследван фенотипно с подкрепата на доц. д-р Благой Узунов от катедра “Ботаника” на Софийски университет „Св. Климент Охридски“. На базата на морфологични характеристики и липсата на пиреноид в клетката, с помощта на определител се направи заключение, че наблюдаваните микроорганизми са близки до представители на род *Chlorella*, семейство *Chlorophyceae*. Микроскопска снимка е показана на (фиг. 3). За да се определи видовата принадлежност са проведени генетично-молекулярни изследвания. Направена е PCR амплификация с универсални и специфични праймери, резултатите от която са показани на фиг. 4.

Резултатите от проведеня сравнителен анализ на ITS и *rbcL* последователностите и филогенетичното дърво показват, че секвенираните от нас три фрагмента могат да се свържат с едно семейство *Chlorellaceae* и род *Muriella*. ITS1_2 фрагмента се групира с идентичност от 97% с 6 щама от род *Muriella*, представители на *M. terrestris*, а ITS1_4 секвенцията е с по-висока идентичност 98,28% и също може да се свърже с 6 щама от същия род и вид. Гените *rbcL*, които се намират в хлоропластния геном, показват от една страна, че изследвания ген показва най-добро съвпадение с 99,57% идентичност само с две секвенции на *Muriella* sp., но *rbcL* последователността се отделя и от двата щама *Chlorella sorokiniana* и *Chlorella* sp. присъстващи в NCBI базата данни и дървото. За определянето на izolата до вид са необходими допълнителни молекулярно-генетични анализи. Резултатите от филогенетичните изследвания са представени на фиг. 5 А), В) и С).



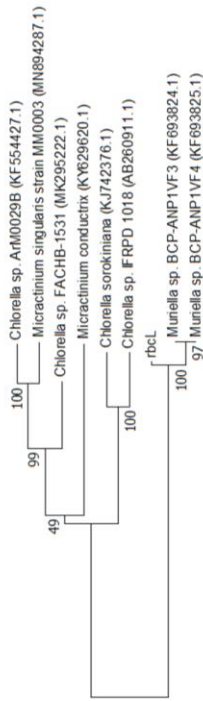
Фиг. 4. PCR амплификация на ДНК от изолирани микроводорасли с универсални праймери (ITS1, ITS2 и ITS4) и специфични праймери (*rbcL*_F и *rbcL*_R).



A)



B)



C)

Фиг. 5. Neighbor-joining филогенетични дървета, конструирани с помощта на нуклеотиди последователности на PCR фрагментите ITS 1_2, ITS1_4, rbcL и най-близките последователности, получени след Blast търсене в NCBI база данни с посочен техния номер за присъединяване в NCBI. Стойностите на Bootstrap са показани в точките на клона (процент от 1000 тествания). Филогенетични дърво и връзки на изследваните

A) Its 1_2 фрагмент,

B) ITS1_4 фрагмент,

C) rbcL фрагмент,

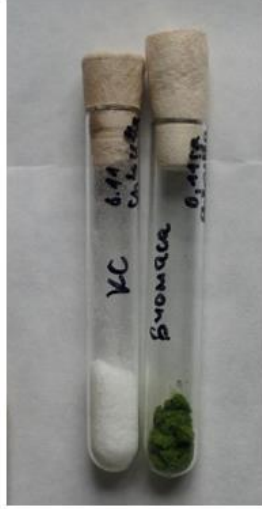
базиран на дистанционен анализ по метода Neighbor-joining. Като външен клон е използван във филогенетичното дърво клон Uncultured fungus.



А) *A. africana*



В) *N. somnifera*



С) ХПВ-А1

Фиг. 6. Лиофилизирани екстракти



А) *A. africana*



В) *N. somnifera*



С) ХПВ-А1

Фиг. 7. Алкохолни екстракти

3. Получаване на екстракти от микроводорасли

Екстрактите от микроводорасли са изсушени чрез вакуумно-сублимационно сушене и чрез ротационен вакуумен изпарител в Лаборатория „Експериментална алгология“, ИФРГ, Българска Академия на Науките и в лабораторията на катедрата по „Биотехнологии“ на Софийски университет „Св. Климент Охридски“. Получени са общо 14 лиофилизирани продукти. Алкохолните екстракти са 3 на брой и са получени чрез ротационен вакуумен изпарител, където етанолът е изпарен. Снимки на част от екстрактите са показани на (фиг. 6. А), В) и С) и (фиг. 7. А), В) и С).

4. Биохимичен състав на микроводорасли

Изследванията са проведени в Лаборатория „Експериментална алгология“, ИФРГ, БАН и в катедра „Физиология на растенията“, Софийски университет „Св. Климент Охридски“. Анализите включват количествено определяне на съдържанието на белтъци, въглехидрати, липиди и пигменти. Резултатите са представени в Табл. 1.

Микроводорасли	Биохимичен състав на биомаса				
	Белтъци %DW	Въглехидрати %DW	Липиди %DW	Пигменти %DW	Други %DW
<i>A. africanum</i>	51,5%	31,0%	5,2%	1,5%	10,8%
<i>N. commune</i>	30,9%	15,8%	5,2%	0,6%	47,5%

Табл. 1. Биохимичен състав на биомаса

5. Определяне на биохимични показатели, характеризиращи антиоксидантната активност на микроводорасловите екстракти

Резултатите от антиоксидантната активност на изследваните щамове *A. africanum* и *N. commune* са публикувани от Petrova et al. (2020).

Антиоксидантната активност е определена по следните показатели: общо съдържание на феноли, общо съдържание на флавоноиди и тотална антиоксидантна активност (ТАА). Най-високо ниво на тотална антиоксидантна активност е измерено в алкохолния екстракт от биомасата на *A. africanum* (362.1 mM g⁻¹ DW), следвано от нискотемпературния екстракт (53.4 mM g⁻¹ DW). Най-ниска ТАА е измерена в екзополисахаридната фракция. Културалната среда показва леко повишена активност в сравнение с екзополисахаридната фракция. Този резултат може да се обясни с факта, че клетките на водораслите активно секретират и екскретират голямо количество метаболити и ензими в културалната среда, които могат да проявяват различна биологична активност. Като цяло, съдържанието на общи феноли и флавоноиди е по-високо в продуктите, получени от биомаса на *A. africanum*.

Максимално количество флавоноиди е отчетено в алкохолния екстракт от биомасата на *A. africanum* (84.9 ± 2.5 mg QE/g DW). Най-ниско е съдържанието на флавоноидите във водните екстракти в екзополисахаридна (0,62 ± 0,02 mg QE/g DW). Резултатите за общите флавоноиди отново са най-високи в алкохолния екстракт от биомасата на *N. commune* (70,6 ± 2,8 mg QE/g DW). Най-ниски са стойностите в екзополисахаридните фракции и културалната среда, следвани от нискотемпературния и високо-температурния екстракт. Най-голяма разлика е установена по отношение на ТАА, която е 3 пъти по-висока в алкохолния екстракт на *A. africanum* в сравнение с *N. commune*.

При *XPB-A1* е направена серия от концентрации на метанолови екстракти от лиофилизирани културална среда (10, 200 и 400 mg/ml) и биомаса (10 и 150 mg/ml). Най-високо съдържание на общи феноли се открива в биомасата на *XPB-A1*, докато в културалната среда е около 8 пъти по-ниско. При концентрация 10 mg/ml, количеството на извлечени феноли е най-високо, докато с увеличаване на сухото вещество, ефективността на екстрахиране намалява. В биомасата на *XPB-A1* беше

установена сравнително висока антиоксидантна активност, измерена чрез DPPH метода. В културалната среда не беше измерена DPPH-активност.

Анализите на тоталната антиоксидантна активност на водни екстракти (високо- и нискотемпературен) от биомасата на *XIV-A1* показаха аналогични стойности – 3.9 mM g⁻¹ LW и 3.82 mM g⁻¹ LW. В културалната среда не беше установена ТАА.

В заключение, алкохолните екстракти, получени от биомасата на изследваните микроводорасли, имат най-силно изразена антиоксидантна активност – максимални количества фенолни и флавоноидни съединения. Антиоксидантните свойства на микроводораслите са все още слабо проучени, поради което изследването на тези свойства в някои нови и перспективни щамове може да играе съществена роля при изясняване на тяхната екофизиология.

6. Определяне на антимикробната активност на микроводораслови екстракти

В дисертационния труд са използвани 44 щамове тест микроорганизми, от които 28 са патогенни за човека, а 16 са фитопатогени, причиняващи заболявания по овощни и земеделски култури. Чувствителността на избраните тест микроорганизми е определена по диск-дифузионния метод на Бауер-Кърби и впоследствие е определена минимална инхибираща концентрация на част от щамовете по метода на микроразреждане в бульон. Получените резултати са сравнени с действието на антибиотик (гентамицин) за човешките патогени и меден сулфат за фитопатогените.

6.1. Нов метод за определяне на зона на инхибиране по снимков материал

По време на изследването се наложи често да се използва снимков материал (основно за верифициране на резултати). Несъвършенствата на фотографските снимки и най-вече честия перпендикулярен зрителен

ъгъл бяха често срещан проблем. Поради тази причина беше създаден нов метод за измерване на зона на инхибиране по метода на Бауер-Кърби чрез употреба на снимков материал и беше създаден специализиран софтуерен продукт, който работи по този метод. Резултатите са публикувани в (Petrova and Petrov, 2021).

6.2. Определяне на микробната чувствителност към екстракти от *A. africanum*

Чувствителността на човешките патогени към КС и ЕкПЗ е показани на (фиг. 16), а на продуктите от биомасата ВТ, НТ и АЕ са показани на (фиг. 17). Антимикробната активност на културалната среда срещу фитопатогени е показана на (фиг. 18). Сравнение между инхибиторна активност на КС и АЕ от *A. africanum* към човешки патогени е представен на (фиг. 19).

Културалната среда е ефективна срещу 92,6% от всички тествани щама. Инхибирани са 26 Грам-отрицателни, 10 Грам-положителни и 2 гъбни потогена. Отчитат се както бактерицидни, така и бактериостатични зони, като въздействието на екстракта е широкоспектрно. Част от резултатите са представени на Фиг. 8.



Staphylococcus sp.

P. acnes

C. glabrata

Фиг. 8. Антимикробна активност на КС от *A. africanum* срещу избрани патогени

Екзополизахаридът е активен срещу по-малко на брой щамове в сравнение с културалната среда. Инхибиране се наблюдава при 8 от 21 тествани щама, по-голямата част от които са Грам-отрицателни бактерии. Това са *E. coli* ATCC 25922 със зона на инхибиране от (8 mm),

P. aeruginosa НБПМКК 3700 със зона на инхибиране от (10 mm), *Pseudomonas* – изолат със зона на инхибиране от (7,5 mm), *P. mirabilis* НБПМКК 8747 със зона на инхибиране от (12 mm), *K. pneumoniae* НБПМКК 3670 със зона на инхибиране от (8 mm). От Грамположителните са инхибирани (*B. cereus* НБПМКК 1085 със зона на инхибиране от (11 mm), *S. aureus* ATCC 25923 със зона на инхибиране от (10 mm) и *C. albicans* НБПМКК 74 със зона от (8 mm).

Високо-температурният екстракт е ефективен срещу 16% от тестваните щамове, докато екстрактът получен по ниско-температурния метод показва активност срещу 21%. Най-слабо активен е алкохолния екстракт, активност има само при 3 щама: *P. aeruginosa* НБПМКК 3700 със зона на инхибиране от (8 mm), *P. mirabilis* НБПМКК 8747 със зона на инхибиране от (26mm) и *C. albicans* НБПМКК 74 със зона на инхибиране от (8 mm).

Културалната среда е най-ефективна срещу фитопатогенните бактерии, като инхибира 94,1% от тях. Не се отчита никаква чувствителност на фитопатогенните бактерии по отношение на продуктите, получени от биомасата (ВТ, НТ и АЕ) и от екзополisahаридната фракция, отделена от културалната среда. Част от резултатите са представени на Фиг. 9.



E. amylovora

B. gladioli

X. vesicatoria

Фиг. 9. Антимикробна активност на КС от *A. africanum* срещу фитопатогени

От всички 41 изпитвани щама (човешки и фитопатогени), два щама (*S. typhimurium* НБПМКК 3669 и *C. michiganensis* НБПМКК 2425) проявяват резистентност, към всички тествани екстракти. Три щама (*P.*

aeruginosa НБПМКК 3700, *P. mirabilis* НБПМКК 8747 и *C. albicans* НБПМКК 74) са чувствителни към всички екстракти. Най-голяма чувствителност с големи бактерицидни зони, са определени за *P. mirabilis* НБПМКК 8747 към всички екстракти, като най-голямата отчетена зона е за ВТ екстракт с отчетена зона от (25 mm), следва *P. aeruginosa* НБПМКК 3700 ВТ екстракт със зона на инхибиране от (15 mm), *B. cereus* НБПМКК 1085 ВТ със зона от (13 mm). От бактериостатичните зони, с най-голямо действие са отчетени при Грам-положителните - *L. innocua* НБПМКК 8755 със зона от (24 mm), *E. faecalis* НБПМКК 3915 със зона на инхибиране от (20 mm), *S. epidermidis* НБПМКК 3486 с отчетена зона от (15 mm), а от Грам-отрицателните - *P. mirabilis* НБПМКК 8747 със зона на инхибиране от (26 mm) и *P. aeruginosa* АТСС 27853 с отчетена зона от (16 mm).

6.3. Определяне на микробната чувствителност към екстракти от *N. commune* Vaucher

Чувствителността на човешките патогени към екстракти, получени от *N. commune* (КС, ЕкПЗ и ЕнПЗ) са показани на (фиг. 20), а антимикробната активност на продуктите от биомасата (НТ, ВТ и АЕ) са изобразени на фигура (фиг. 21).

Анализът е проведен с 28 щама, тествани срещу 6 екстракта. Резистентни към всички екстракти са *Listeria* – *изолат* и *C. glabrata* АТСС 2001, съответно чувствителен е един шам *C. albicans* НБПМКК 74. По ефективна е КС в сравнение с ЕкПЗ и ЕнПЗ. Между НТ и ВТ екстракт по-ефективен е НТ. Действието му е широкоспектърно, тъй като обхваща двете големи групи бактерии и един шам дрожди - *C. albicans* НБПМКК 74. Превес имат Грам-положителните бактерии: *B. cereus* НБПМКК 1085, *E. faecalis* НБПМКК 3915, *L. innocua* НБПМКК 8755, *S. aureus* АТСС 6538, *S. epidermidis* НБПМКК 3486, *Bacillus sp.-хранителен изолат* и фитопатогена *C. michiganesis* НБПМКК 2425 (Фиг. 10).



Фиг. 10. Антибактериална активност на *N. commune* срещу *C. michiganensis*

Получените резултати се подкрепят от Shaieb et al. (2014) и се обясняват с това, че съединението Noscomin 57, което се съдържа в *N. commune*, показва антибактериална активност. Такова изследване срещу *B. cereus*, *S. epidermidis* и *E. coli* е представено от Jaki et al. (1999). Jaki et al. (2000) докладват за съставки с антибактериална активност от *N. commune* - дитерпеноидите Comnostin A, Comnostin B, Comnostin C, Comnostin D, Comnostin E, както и Noscomin, които авторите отбелязват, че имат освен антибактериално, така и антигъбно действие. Като антигъбен агент за *N. commune* са докладвани алкалоида Nostodion A от Bhadury and Wright (2004) и липопептида Nostofungicidine от Kajiyama et al. (1998).

АЕ инхибира най-малко на брой щамове само 4 от 28 тествани щама: *P. mirabilis* НБПМКК 8747 със зона от 9mm, *S. epidermidis* НБПМКК 3486 със бактериостатична зона от (7 mm), *Bacillus sp.* със бактериостатична зона от (11 mm) и *C. albicans* НБПМКК 74 със бактерицидна зона от (8 mm). Според Najdenski et al. (2013) етанолови екстракти от *Nostoc sp.* показват антибактериална активност срещу *S. aureus*. В изследването от дисертационния труд това не се подкрепя при *N. commune*, но са получени резултати срещу *S. epidermidis* НБПМКК 3486. Нашите резултати показват активност на етаноловия екстракт срещу два Грам-положителни, един Грам-отрицателен и един гъбен патоген с широкоспектърно действие. Повечето резултати се подкрепят от Nameed et al. (2013) – различни са само при *P. mirabilis*.

6.4. Определяне на микробна чувствителност към екстракти от *XPB-A1*

Чувствителността на човешките патогени към продуктите от биомасата на *XPB-A1* са показани на (фиг. 22), а инхибиторната активност културална среда на *XPB-A1* е показана на (фиг. 23). Антимикробната активност на културална среда от *XPB-A1* срещу фитопатогенните бактерии е показана на (фиг. 24).

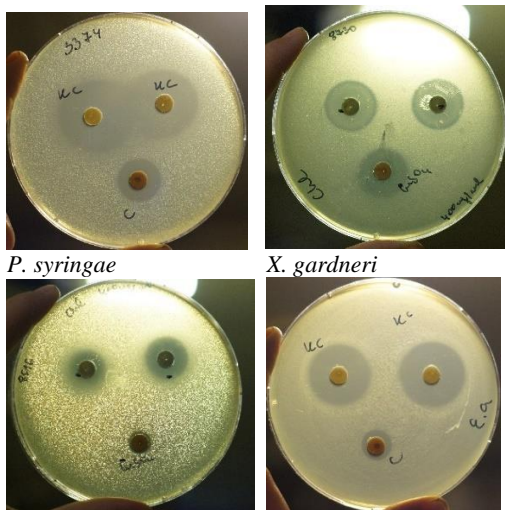
Изследвана е чувствителността на 32 щама, който включват човешки патогени, фитопатогени и гъби срещу 5 екстракта получени от микроводораслото *XPB-A1*. Най-ефективна е КС, която инхибира повече от половината тествани щамове с 62,5%. Действието ѝ е широкоспектърно, тъй като е насочено и към двете групи бактерии. Прави впечатление, че от Грам-отрицателните са инхибирани само фитопатогенните бактерии, а човешките патогени са резистентни. От Грам-положителните бактерии обратно, инхибирани са *V. cereus* НБПМКК 1085, *Bacillus sp. изолат*, *E. faecalis* НБПМКК 3915, *Enterococcus – изолат* (Фиг. 11) и *L. innocua* НБПМКК 8755, а единствения фитопатоген е резистентен. Човешките патогени *C. albicans* НБПМКК74 и *C. glabrata* ATCC 2001 също са резистентни.



Фиг. 11. Антимикробна активност на *XPB-A1* срещу *Enterococcus – изолат*

АЕ при концентрация 50 mg/ml инхибира само 2 от 25 тествани щама, това са *S. aureus* ATCC 6538 и *P. aeruginosa* ATCC 27853. Те показват бактерицидна активност с малки зони от (7 до 8 mm). Слаби активности се наблюдават и при останалите екстракти, като действието

е насочено към Грам-положителни щамове: *B. cereus* НБПМКК 1085, *Bacillus sp. изолат*, *E. faecalis* НБПМКК 3915, *Enterococcus* – изолат, *L. innocua* НБПМКК 8755 и *S. aureus* ATCC 6538. По отношение на ВТ, НТ и АЕ една от причините за слабата активност на екстрактите би могло да бъде изборът на екстрактант или неуспешно разрушаване на клетъчната стена. Maregesi et al. (2008) и Ghasemi et al. (2010) изказват мнение, че може да се търси причина и в концентрацията на екстрактите. Ghasemi et al. (2010) също твърдят, че резистентността може да се свърже с ензим, намиращ се в периплазменото пространство, който може да разгражда молекулите, въведени отвън.



P. syringae

X. gardneri

B. gladioli

E. amylovora

Фиг. 12. Антибактериална активност на *XIB-A1* срещу избрани фитопатогени

Относно *XIB-A1* (хлорелоподобно водорасло) е извършено сравнение с някои видове на р. *Chlorella*. Изследванията за *Chlorella* срещу фитопатогени са много малко в научната литература и едно такова изследване е публикувано от Ranglová et al. (2021). Там е използван воден екстракт от биомасата на 10 различни щама от р. *Chlorella* срещу фитопатогенните бактерии: *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *X.*

campestris pv. *vesicatoria*, *P. syringae* pv. *tomato*. От тях само 2 проявяват активност срещу *C. michiganensis*, 7 срещу *X. campestris* и 1 срещу *P. syringae*. Нашите резултати показват активност на КС от ХПВ-А1 върху всички фитопатогенни шамове от р. *Xanthomonas* и р. *Pseudomonas* с изключение на *C. michiganensis* НБПМКК 2425, като това не подкрепя резултата получен от Ranglová et al. (2021). Разликата може да се обясни с това, че там тестват екстракт от биомасата, а също и различни видове от р. *Chlorella*. Част от резултатите са показани на (Фиг. 12).

6.5. Определяне на МІС и МВС на културална среда от *A. africanum*

Определена е МІС на 16 шама към КС на *A. africanum*. Колкото по-ниски са стойностите на МІС, толкова по-ефективен е екстрактът. Най-ниската стойност е отчетена при *Pseudomonas* - *изолат* МІС=25 mg/ml и МВС=50 mg/ml. Най-високата отчетена стойност на МІС е равна на 100 mg/ml. Такива са получените резултати срещу *S. epidermidis* НБПМКК 1085 МІС=100 mg/ml и МВС=200 mg/ml, *E. faecalis* НБПМКК 3915 МІС=100 mg/ml и МВС=200 mg/ml и *L. innocua* НБПМКК 8755 МІС=100 mg/ml и МВС= 200mg/ml. МІС индексът показва бактерицидно действие на екстрактите, според съответните стойности. За сравнение е изчислена МІС на антибиотик (гентамицин) като действието на културалната среда е около хиляда пъти по-слабо от това на широкоспектърния антибиотик.

Според Kitonde et al. (2013) екстрактите с най-малка стойност на МІС притежават най-висока активност. В направените анализи за екстракта от *A. africanum* в този диапазон влизат стойностите на МІС, които съответстват на (3,12 и 6,25 mg/ml). Те са получени за *X. vesicatoria* 60t МІС=3,12 mg/ml и МВС=6,25 mg/ml, *X. gardneri* 62t и *X. vesicatoria* 68t МІС=6,25 mg/ml and МВС=12,5 mg/ml. От типове култури това са *B. gladioli* pv. *alliicola* НБПМКК 8616 и *B. gladioli* pv. *gladioli* НБПМКК 8569 МІС=6,25 mg/ml и МВС=12,5 mg/ml. Следва *X. vesicatoria* НБПМКК 2427 МІС=12,5 mg/ml и МВС=50 mg/ml и *E. amylovora* НБПМКК 8492

MIC=25 mg/ml и MBC= 50 mg/ml. В сравнение с положителната контрола меден сулфат действието на екстракта е от 7 до 8 пъти по-слабо. В категорията на умерено чувствителните попада *P. acnes* НБПМКК MIC=50 mg/ml и MBC=100 mg/ml.

MIC не е определена за *X. perforans* НБПМКК 8729, тъй като екстрактът има бактериостатичен ефект. Също не е определен за *X. gardneri* НБПМКК 8730, *X. euvesicatoria* НБПМКК 8731, *P. syringae* pv. *tomato* НБПМКК3374, *X. gardneri* 64t, *X. euvesicatoria* 105t, *X. euvesicatoria* 269 и *P. syringae* pv. *tomato* 32f, защото показват зони на инхибиране по-малки от 13 mm.

6.6. Определяне на MIC и MBC на екстракти от *N. commune*

Не е отчетена антибактериална активност с бактерицидна зона по-голяма или равна на 13 mm. Поради тези причини MIC и MBC не е изчислявана.

6.7. Определяне на MIC и MBC на екстракти от *XPB-A1*

Определена е MIC на КС, ВТ и НТ екстракти срещу 22 щама, включващи фитопатогени и човешки патогени. Резултатите от дисертационното изследване показват, че в границите с най-ниска концентрация попадат щамове: *X. gardneri* НБПМКК 8730, *X. vesicatoria* НБПМКК 2427, *X. perforans* НБПМКК 8729, *B. gladioli* pv. *gladioli* НБПМКК 8569, *E. amylovora* НБПМКК 8492. При всички тях MIC= 12,5 mg/ml и MBC=25 mg/ml. Това е много по-слабо спрямо синтетични антибиотици, но е сравнимо спрямо други изследвания за микроводорасли. Следва *P. syringae* pv. *tomato* НБПМКК 3374 с MIC=25 mg/ml и MBC=50 mg/ml, *X. euvesicatoria* НБПМКК 8731 с MIC=50 mg/ml и MBC=100 mg/ml и *B. gladioli* pv. *alliicola* НБПМКК 8616 с MIC=100 mg/ml и MBC=200 mg/ml. По отношение на ВТ и НТ екстракти при конц. 100 mg/ml не е установена MIC. Определена е MIC на CuSO₄, който

служи за положителна контрола. Не е установен екстракт, чиято концентрация да е равна или по-голяма от него.

Определен е MIC индекс, който показва какво е действието на екстракта бактериостатично или бактерицидно. Действието на всички щамове с изключение на резистентните е бактерицидно, тъй като MIC индекс = 2.

По отношение на човешките патогени КС е най-ефективна срещу *Enterococcus*-изолат с MIC= 100 mg/ml и MBC= 200 mg/ml, по-малко чувствителна е типовата култура *E. faecalis* НБПМКК 3915, при която се отчита MIC=200 mg/ml и MBC= 400mg/ml. При останалите щамове *Pseudomonas – изолат*, *B. cereus* НБПМКК 1085, *Bacillus sp. изолат*, *L. innocua* НБПМКК 8755 и *Listeria – изолат* е отчетен MIC= 400 mg/ml, което съответства на изходната концентрация на екстракта. MIC за ВТ и НТ екстракти при конц. 100 mg/ml не са установени с изключение на щамове *L. innocua* НБПМКК 8755 MIC_{ВТ} = 100 mg/ml и MIC_{НТ} = 50 mg/ml срещу *Enterococcus*-изолат. Определена е MIC на антибиотик гентамицин, който служи за контрола.

Като извод от получените резултати за MIC, фитопатогенните бактерии се инхибират най-силно от екстракта на културалната среда от *A. africanum*, с изключение на *E. amylovora* НБПМКК 8492, която е по-чувствителна към екстракта получен от културалната среда на *XPB-A1*, а един щам *C. michiganens* е резистентен към екстрактите и на двата щама микроводорасли.

Много е трудно да се направи оценка на степента на активност по четиристепенна скала „висока-средна-ниска-неактивна“. Ако например трябва да се прави сравнение със синтетични антибиотици, за екстрактите от микроводорасли би излязло, че са неактивни. Има и силна разлика между различни видове растителни екстракти. Затова и много често авторите оценяват своите резултати без да цитират конкретно по каква скала са приели това. Например според Kitonde et al. (2013) концентрации на екстракт от *Vernonia glabra* в диапазона от 0.2 до 15,625

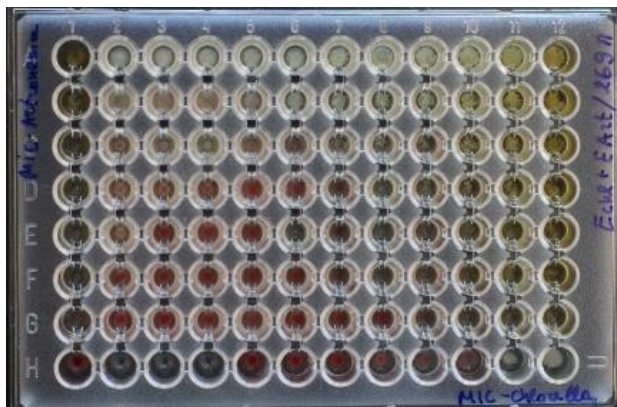
mg/ml би следвало да се приеме за индикатор за висока активност, от 31,25 до 62,5 mg/ml за средна активност, а от 125 mg/ml и по-високи за слабо активни – разбира се авторите са го описали спрямо получените от тях резултати и поради тази причина интервалите не са свързани. Holetz et al. (2002) са изследвани медицински растения и там е прието, че концентрации по-малки от 0,1 mg/ml са с висока активност, от 0,1 до 0,5 mg/ml са средни, от 0,5 до 1 mg/ml са слаби, а над 1 mg/ml са неактивни. Вижда се ясно, че разликата е огромна и тя се дължи на спецификата на изследваните растения – някои са толкова по-силни от други, че скалите или стават неадекватни, или се отместват така, че да са несравними. Вероятно би било добре да се приемат различни стандартизирани скали спрямо различни видове екстракти, но на този етап такива не бяха открити. Поради тази причина в дисертационния труд беше прието да се направи въздържане от употреба на подобни оценки, а вместо това да се представят суровите резултати и да бъде оставена възможността изследователите сами да сравняват и оценяват спрямо получени техни.

6.8. Проучване на ефекта от комбинираното действие на микроводораслови екстракти срещу фитопатогенни бактерии

Сравнение на MIC на културална среда от *A. africanum* срещу човешки патогени и фитопатогени е показано на (фиг. 26), а за *XPIB-A1* е показано на (фиг. 27). Последва изследване за евентуален синергичен ефект между двете микроводорасли.

В анализа са използвани два микроводораслови екстракта от *A. africanum* и от *XPIB-A1*, които по отделно притежават бактерициден ефект срещу тестваните фитопатогенни бактерии. Те се смесват в различно съотношение и полученият нов антибактериален агент се изследва за възможен синергичен ефект срещу тестваните бактерии. По този начин ще се определи каква е оптималната концентрация и идеалното отношение отговарящо на синергична активност. В

изследването от дисертационния труд не е установен синергизъм между тестваните микроводораслови екстракти, но не е и антагонистично. Това означава, че сумата от тяхното действие е сравнима с техните индивидуални ефекти поотделно.



Фиг. 13. Определяне на FIC на културална среда от *A. africanum* и XIIВ-А1 срещу *X. euvesicatoria* 269p.



Фиг. 14. Определяне на FIC на културална среда от *A. africanum* и XIIВ-А1 срещу *Pseudomonas* 32f

Не са намерени проучвания за използването на комбинирана терапия в комбинация от микроводорасли, поради което получените резултати не биха могли да бъдат сравнени. При такива обстоятелства

може да се генерализира заключение с хипотеза, че *XPB-A1* и *A. africanum* не си взаимодействат.

На (Фиг. 13) и (Фиг. 14) са представени две микротитърни плаки с изследване на комбинирано действие на двата микловодораслови щама.

7. Определяне на чувствителност на фитопатогенни бактерии към природни антибиотици салиномицин и монензим

Изследването за антибиотиците салиномицин и монензим е представено на (фиг. 25). Двата антибиотика са изолирани от актинобактерии от р. *Streptomyces*, произведени и получени от „Биовет“ АД, гр. Пещера. За разтварянето на търговските продукти е използван абсолютен алкохол („Биомед фючар“ ЕООД), като са приготвени разтвори в необходимите за изследванията концентрации.

За определяне на антимикробната активност на природни антибиотици е използван диск-дифузионния метод върху твърда хранителна среда. Същата методика за определяне на антимикробната активност на салиномицина, по диск дифузионния метод, е описана от Antoszczak et al. (2014). Там авторите са направили разрежданията на антибиотика в етанол подобно на опита в дисертационния труд и са ги напоили върху стерилни дискове с определена концентрация на антимикробния агент.

Тествани са 16 фитопатогенни бактерии за антибиотична чувствителност към два природни антибиотика: монензим и салиномицин. Те са изолирани от актиномицети от р. *Streptomyces*, като монензимът е продуциран от *Streptomyces cinnamonensis*, а салиномицинът от *Streptomyces albus*. Салиномицинът е ефективен към 13 от 16 тествани щама фитопатогена. Чувствителни са основно представители от родове *Xanthomonas*, *Pseudomonas* и *C. michiganensis*, но се проявява резистентност към три щама Грам-отрицателни патогенни бактерии: *B. gladioli* pv. *gladioli*, *B. gladioli* pv. *alliiicola* и *E. amylovora*. Монензимът е

резистентен към всички с изключение на *C. michiganensis*, при който се отчита най-голямата зона с диаметър от 50 mm. Част от резултатите са показани на Фиг. 15.



X. euvesicatoria

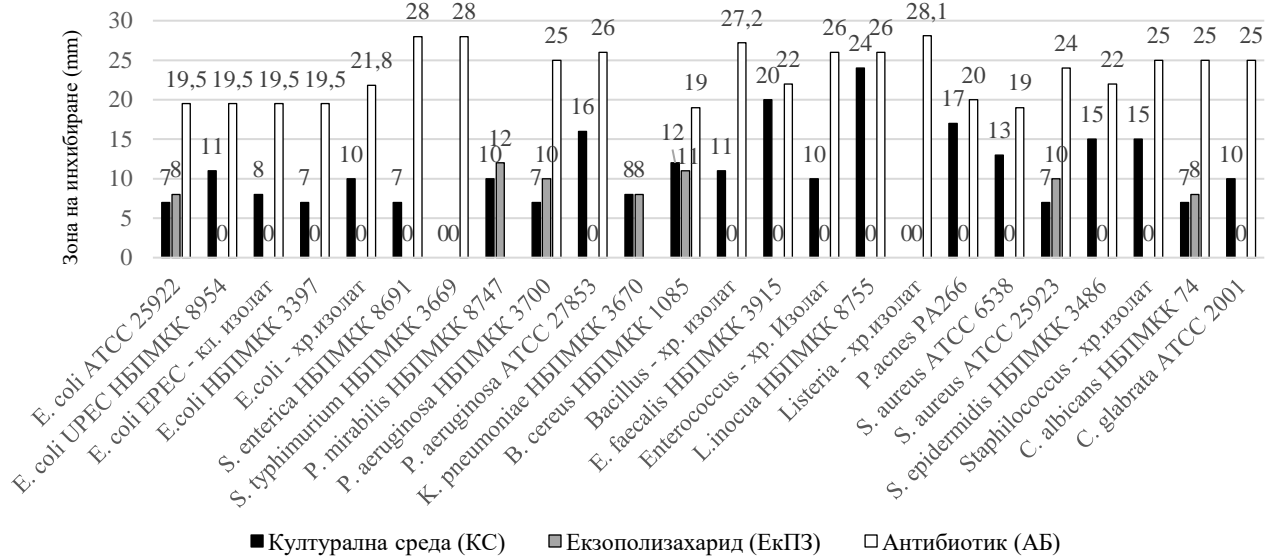
C. michiganensis

C. michiganensis

Фиг. 15. МИС на салиномицин срещу фитопатогени

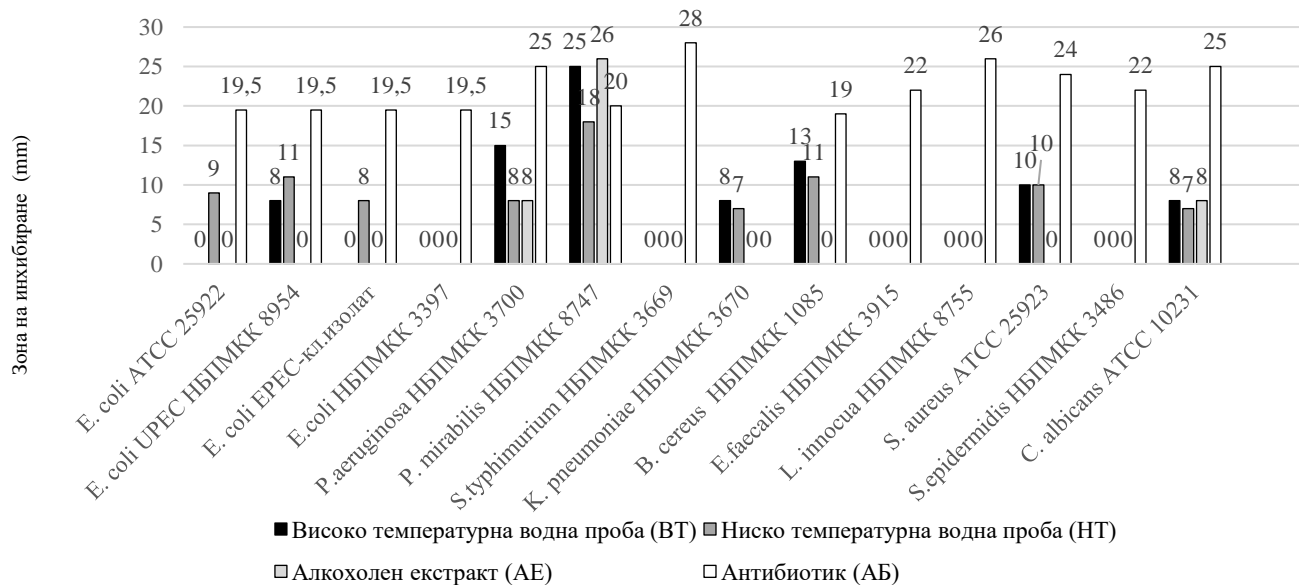
В научната литература не се среща информация, за чувствителността на двата природни антибиотика срещу фитопатогенни бактерии. В работата на Antoszczak, et. al., (2014) са изследвали антимикробната активност на Грам-положителни, Грам-отрицателни микроорганизми и дрожди, като са получили чувствителност при Грам-положителни коки и някои дрожди, а е имало липса на чувствителност при Грам-отрицателните *E.coli*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa*, *Bordetella bronchiseptica*. Авторите обясняват това със структурата на клетъчната стена при Грам-отрицателните бактерии, която не позволява преминаването на хидрофобни молекули с по-голям размер и по този начин стават неподатливи на действието на салиномицина. В противовес с това, изследването от дисертационния труд показва чувствителност срещу салиномицин при почти всички Грам-отрицателни фитопатогенни бактерии, както и единствения тестван Грам-положителен щам.

Инхибиторна активност на КС и ЕкПЗ от *A. africanum*
срещу човешки патогени (типови култури и изолати)



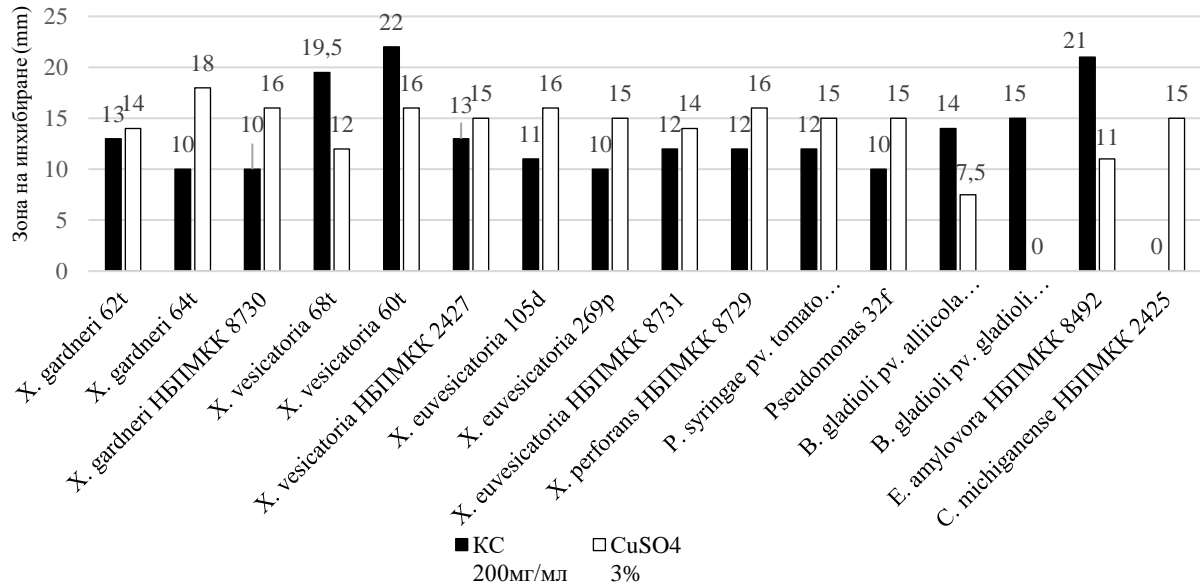
Фиг. 16. Инхибиторна активност на КС и ЕкПЗ от *A. africanum* срещу човешки патогени и антибиотик гентамицин

Инхибиторна активност НТ, ВТ и АЕ на *A. africanum* срещу човешки патогени

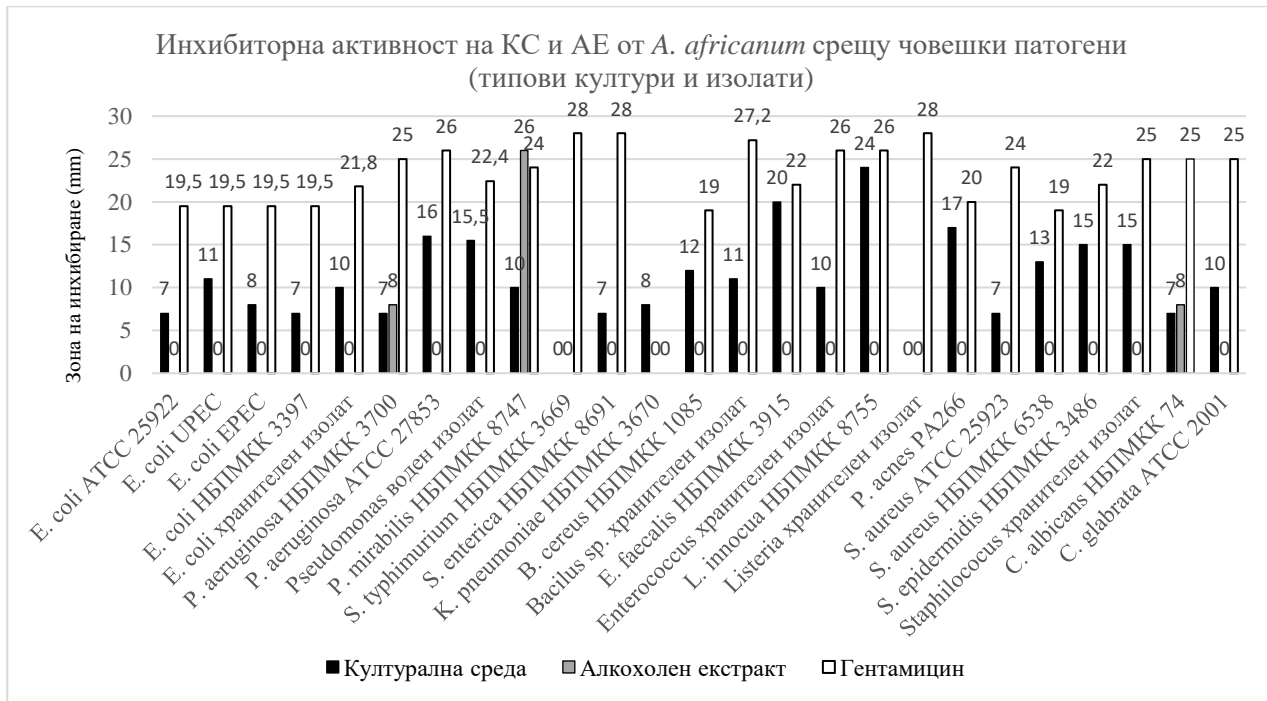


Фиг. 17. Инхибиторна активност на продукти от биомаса на *A. africanum* срещу човешки патогени и антибиотик гентамицин

Антимикробна активност на
КС от *A. africanum* срещу фитопатогени

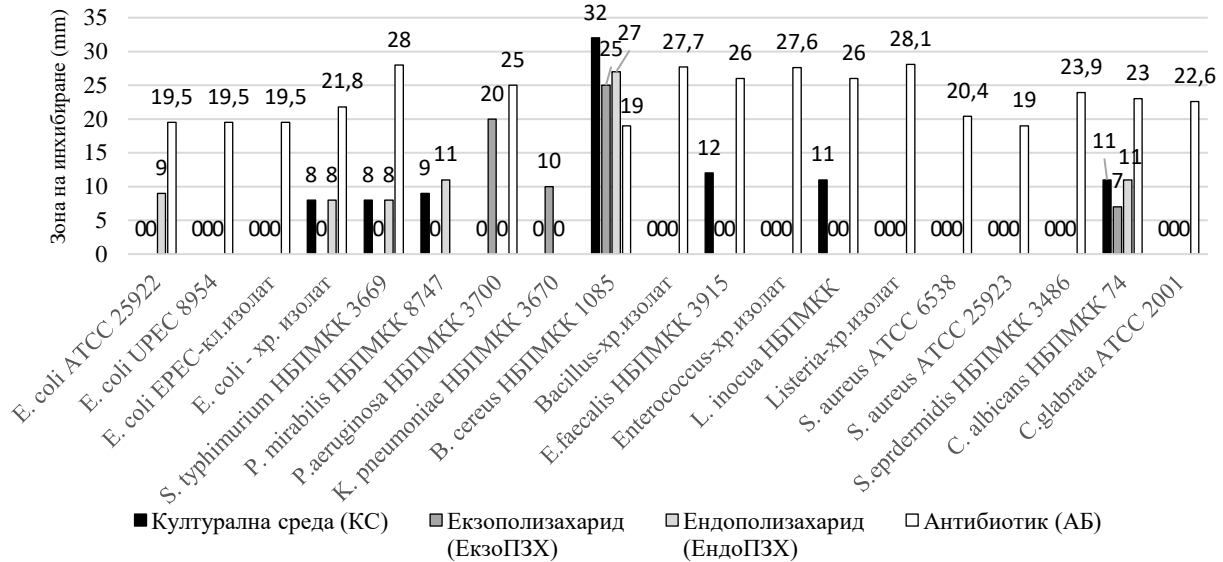


Фиг. 18. Антимикробна активност на КС от *A. africanum* срещу фитопатогени и контрола от меден сулфат



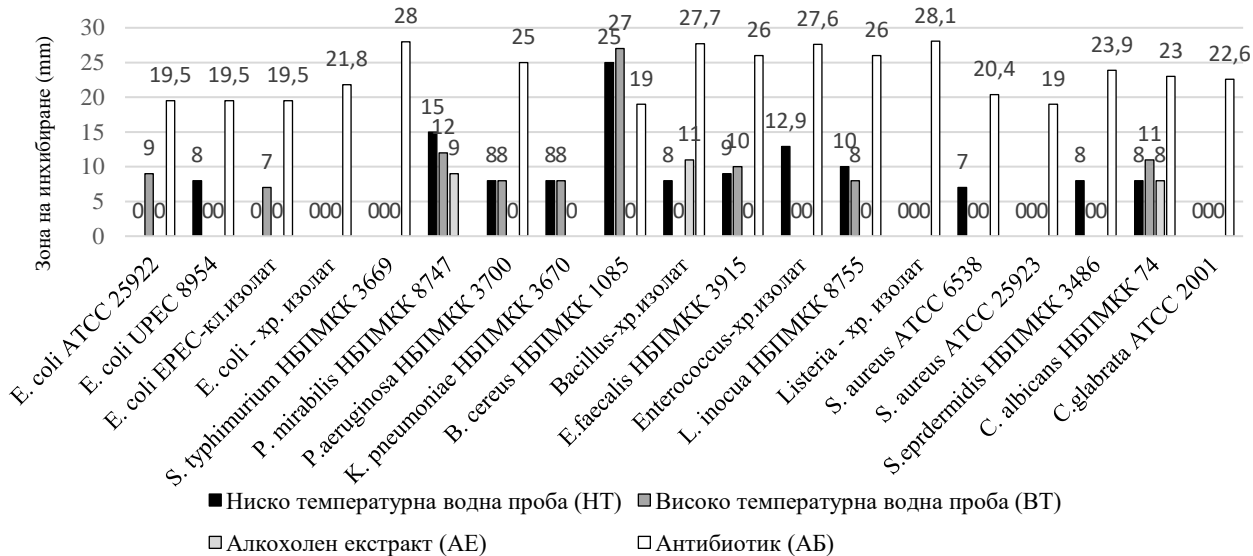
Фиг. 19. Инхибиторна активност на КС и АЕ от *A. africanum* срещу човешки патогени и контрола гентамицин

Инхибиторна активност на КС, ЕкПЗ, ЕнПЗ на *N. commune* срещу човешки патогени (типови култури и изолати)



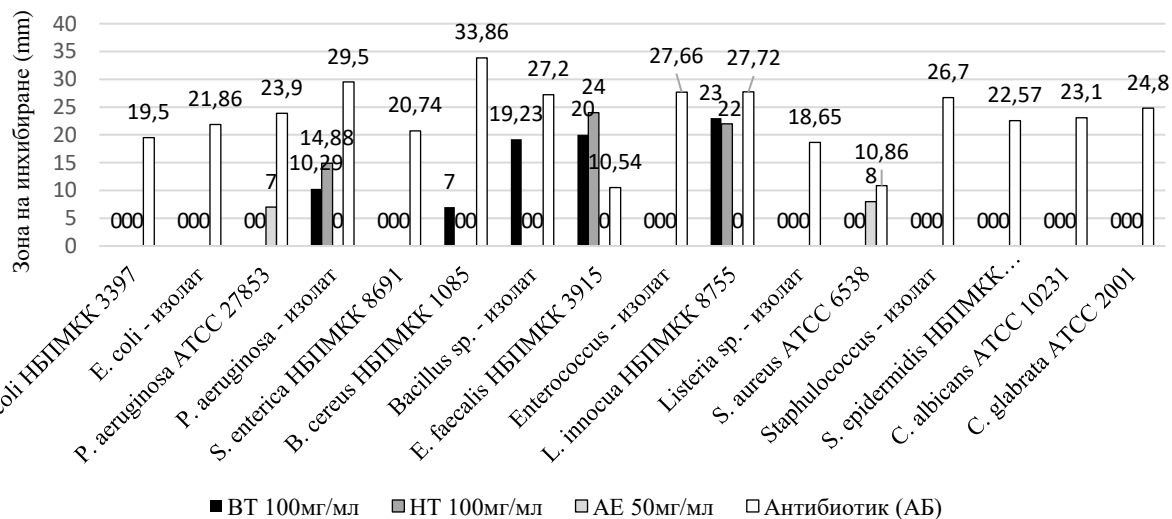
Фиг. 20. Инхибиторна активност на КС, ЕкПЗ, ЕнПЗ на *N. commune* към човешки патогени и контрола гентамицин

Инхибиторна активност на продукти от
биомаса на *N. commune*
срещу човешки патогени (типови култури и изолати)



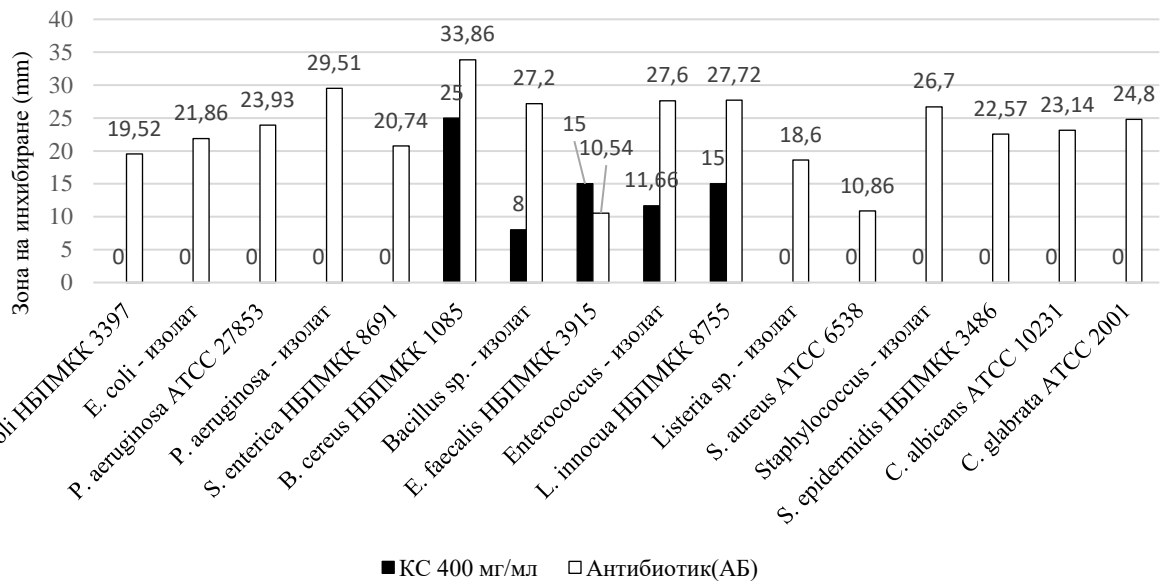
Фиг. 21. Инхибиторна активност на продукти от биомаса на *N. commune* към човешки патогени и контрола гентамицин

Инхибиторна активност на ВТ, НТ и АЕ на *XIV-A1* срещу човешки патогени и изолати



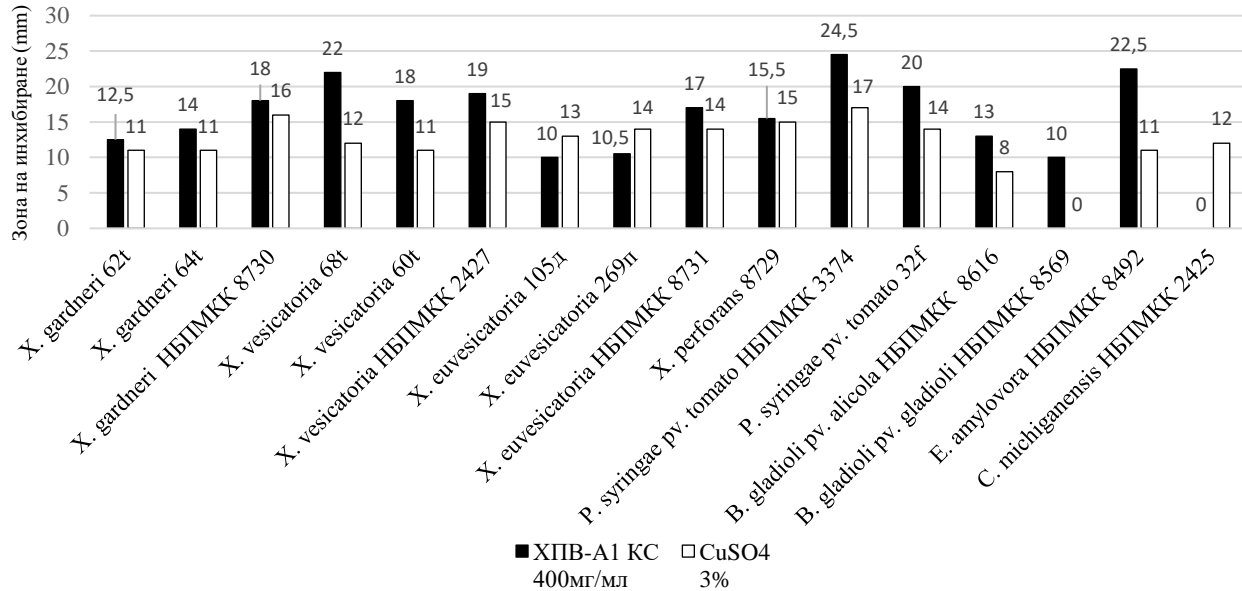
Фиг. 22. Инхибиторна активност на продукти от биомаса на *XIV-A1* към човешки патогени, с контрола гентамицин

Инхибиторна активност на КС от *XIPB-A1* срещу човешки патогени и изолати

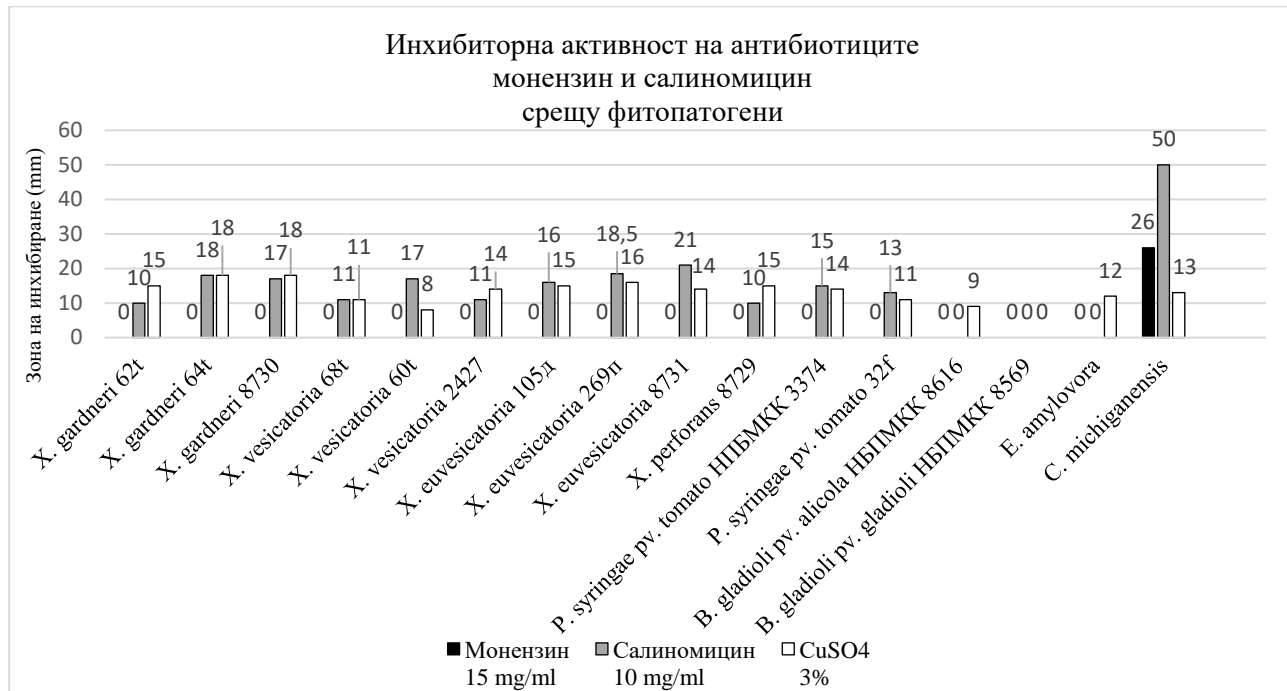


Фиг. 23. Инхибиторна активност на КС от *XIPB-A1* към човешки патогени и контрола гентамицин

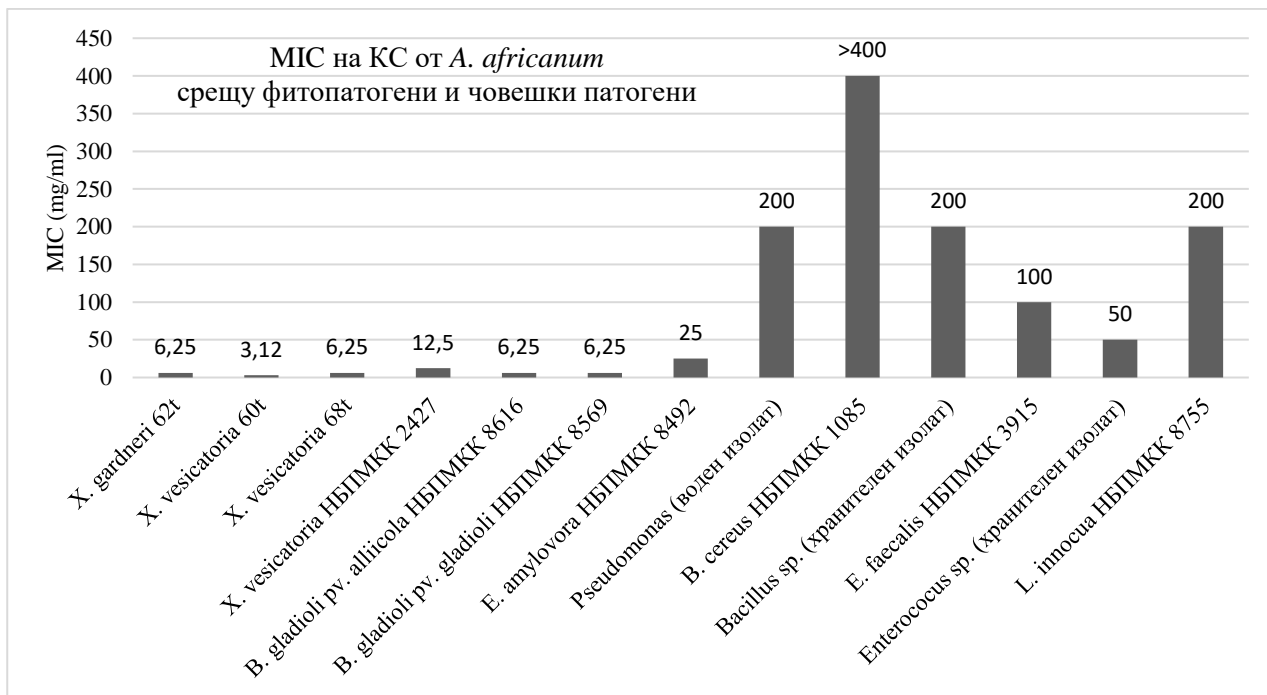
Инхибиторна активност на КС от *XIPB-A1* срещу фитопатогени



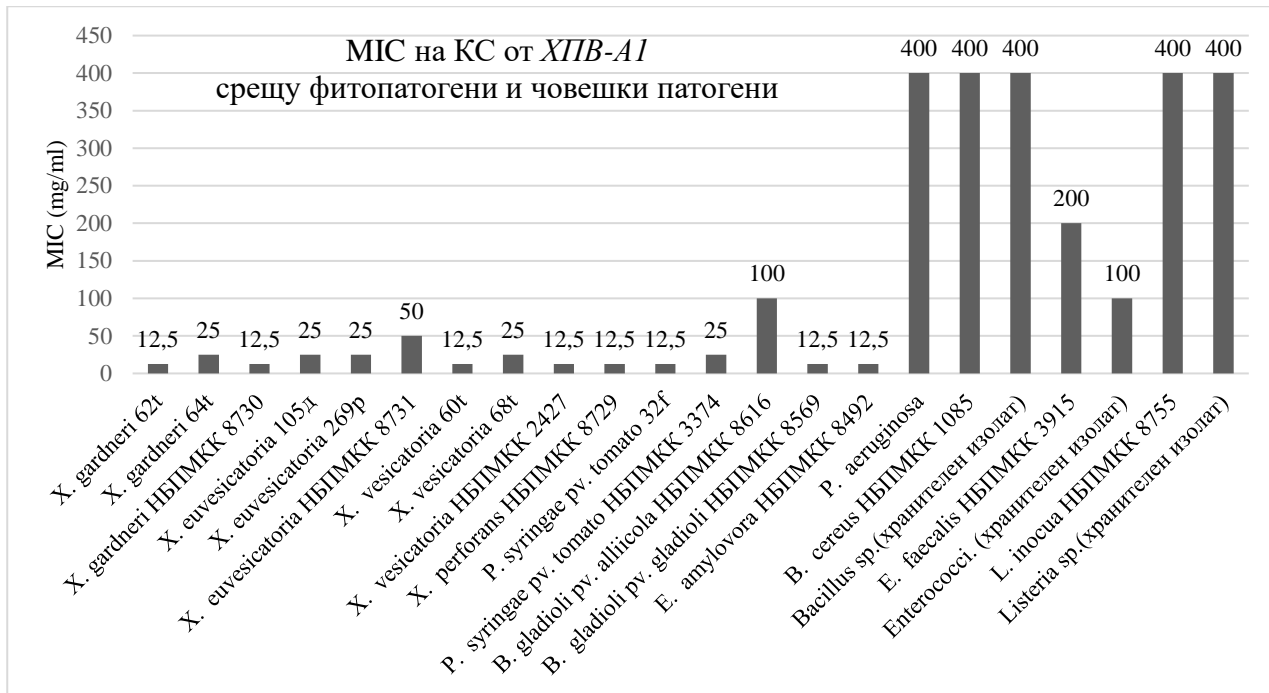
Фиг. 24. Антимикробна активност на КС от *XIPB-A1* към фитопатогени и контрола меден сулфат



Фиг. 25. Инхибиторна активност на антибиотиците монензин и салиномицин срещу фитопатогени и контрола меден сулфат



Фиг. 26. Сравнение на МИС на КС от *A. africanum* срещу човешки патогени и фитопатогени



Фиг. 27. Сравнение на МИС на КС от *XIPB-A1* срещу човешки патогени и фитопатогени

8. Определяне на чувствителността на тестваните щамове към хемоцианин

Относно антимикробната активност на нативния хемоцианин (EvH) и получените от него фракции (SU1-SU5), най-големи зони на инхибиране са отчетени срещу *B. subtilis* (27,5mm) и *E. coli* (22,5 mm), средни по размер при *S. epidermidis* (14-16,5 mm) и *S. enterica* (14-17 mm), а най-малки зони се отчитат срещу *S. aureus* (9,5 mm) и *P. aeruginosa* (9,9 mm). Най-голямо инхибиране и съответно най-високо ефективна фракция е (SU1), като действието и срещу *B. subtilis* е сравнимо с действието на положителната контрола еритромицин, а действието и срещу *E. coli* е по-силно от действието на антибиотика. Най-слабо е действието на фракцията SU3 (Табл.2). Резултатите са публикувани от Kizheva et al. (2019).

Определена е минималната инхибираща концентрация на всички субединици от *E. verrucosa* по метода на ямките в агар. Най-силно повлияни от хемоцианиновите фракции (SU1-SU5) са *B. subtilis* и *E. coli*, при които са отчетени най-ниските стойности на MIC=3,12 µg/ml. и MBC =6,25 µg/ml. Съответно по-слабо са повлияни щамове *S. aureus* и *P. aeruginosa* от фракциите (SU3 и SU4), където са отчетени стойности на MIC=25,0 µg/ml. и MBC=50 µg/ml (Табл.3). Като заключение може да се каже, че хемоцианиновите фракции не проявяват специфичност по отношение на типа клетъчна стена. От друга страна SU1 фракцията е с най-високо съдържание на въглехидрати и с изключение на дрождите, потиска в най-голяма степен растежа на тестваните бактерии. Най-слабо гликолизираните фракции SU3 и SU4, отчитат по-ниска антибактериална активност. Тези резултати показват, че степента на гликолизиране на хемоцианина има връзка с антибактериалната активност. Липсата на активност по отношение на нативния хемоцианин не е очакван резултат, тъй като много проучвания потвърждават инхибиторната му активност.

Табл. 2. Зони на инхибиране в (mm) на нативен хемоцианин (ЕvН) от *E. verrucosa* и неговите субединици (SU1-SU5) срещу човешки патогени.

Човешки патогени	Проби								Полож. контрола	Отриц. контрола
	SU1 mg/ml	SU2 mg/ml	SU3 mg/ml	SU4 mg/ml	SU5 mg/ml	ЕvН 3,0 mg/ml	АБ	ДМСО		
<i>B. subtilis</i> НБПМКК 3562	27,5	26,5	24,0	24,1	25,2	0	27,9	0	0	
<i>S. epidermidis</i> НБПМКК 1093	16,5	16,2	14,1	14,4	15,1	0	20,4	0	0	
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	14,2	13,4	9,5	9,8	11,3	0	19,8	0	0	
<i>S. enterica</i> НБПМКК 8691	17,3	17,2	14,5	14,0	16,5	0	22,3	0	0	
<i>E. coli</i> НБПМКК 3397	22,5	22,1	20,5	21,0	22,2	0	15,8	0	0	
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	13,6	17,7	10,0	9,9	11,8	0	24,0	0	0	
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	0	0	0	0	0	0	14,2	0	0	
<i>C. neoformans</i>	0	0	0	0	0	0	12,8	0	0	

Табл. 3. Определяне на МИС ($\mu\text{g/ml}$) на хемолитинови субединици от *E. verugitosa* срещу човешки патогени.

Тест микроорганизми	Проби											
	SU1		SU2		SU3		SU4		SU5			
	МВС ($\mu\text{g/ml}$)	МИС ($\mu\text{g/ml}$)	МВС ($\mu\text{g/ml}$)	МИС ($\mu\text{g/ml}$)	МВС ($\mu\text{g/ml}$)	МИС ($\mu\text{g/ml}$)	МВС ($\mu\text{g/ml}$)	МИС ($\mu\text{g/ml}$)	МВС ($\mu\text{g/ml}$)	МИС ($\mu\text{g/ml}$)		
<i>B. subtilis</i> НБПМКК 3562	6,25	3,12	6,25	3,12	6,25	3,12	6,25	3,12	6,25	3,12	6,25	3,12
<i>S. epidermidis</i> НБПМКК 1093	12,5	6,25	12,5	6,25	25,0	12,5	25,0	12,5	25,0	12,5	25,0	12,5
<i>S. aureus</i> АТСС 6538	25,0	12,5	25,0	12,5	50,0	25,0	50,0	25,0	50,0	25,0	25,0	12,5
<i>S. enterica</i> НБПМКК 8691	12,5	6,25	12,5	6,25	25,0	12,5	25,0	12,5	25,0	12,5	12,5	6,25
<i>E. coli</i> НБПМКК 3397	6,25	3,12	6,25	3,12	6,25	3,12	6,25	3,12	6,25	3,12	6,25	3,12
<i>P. aeruginosa</i> АТСС 27853	25,0	12,5	25,0	12,5	50,0	25,0	50,0	25,0	50,0	25,0	25,0	12,5

ИЗВОДИ

1. Новоизолираният щам *XPB-1* е определен фенотипно като представител на сем. *Chlorellaceae* и след секвениране на амплифицирани участъци от 18S ДНК, показва хомоложност близка до род *Muriella*. Необходими са допълнителни молекулярни анализи за пълна идентификация;
2. Водните екстракти на *Arthronema africanum* (КС, ЕкПЗ, ВТ и НТ) имат широк спектър на антимикробно действие. Максимална ефективност показва културалната среда;
3. Екстрактите, получени от *Nostoc commune*, проявяват антимикробно действие към човешките патогени. Най-високо активен е НТ екстракт, който инхибира най-силно *Bacillus cereus* и *Proteus mirabilis*;
4. Културалната среда от изолат *XPB-A1* инхибира 62,5% от всички тествани щамове, като действието е насочено предимно към Грам-отрицателните фитопатогенни бактерии;
5. Най-слаба антимикробна активност показват алкохолните екстракти, получени от трите щама микроводорасли;
6. Алкохолните екстракти от биомасата на *A. africanum* и *N. commune* имат силно изразена антиоксидантна активност – установяват се максимални количества феноли, флавоноиди и ТАА;
7. Получена е информация за чувствителност на фитопатогенните бактерии към два природни антибиотика - монензим и салиномицин. По-голяма активност проявява салиномицинът;
8. Хемоцианиновите фракции притежават антибактериална активност, която се повишава със степента на гликолизиране;
9. Културалната среда получена от *A. africanum* и от *XPB-A1* може да бъде използвана за биологичен контрол на фитопатогенни бактерии.

ПРИНОСИ

- Получена е подробна информация за антимикробна активност на различни екстракти от микроводорасли срещу широк спектър на действие към бактерии и гъби;
- За първи път в България са получени данни за антимикробната активност на *Arthronema africanum* и новоизолиран щам зелено микроводорасло ХПВ-А1 към човешки патогени и фитопатогени;
- Получените микроводораслови екстракти имат потенциал за разработване на нов продукт за биоконтрол срещу фитопатогенни бактерии;
- Получена е нова информация за антиоксидантната активност на екстракти от микроводорасли;
- Разработен е софтуер за улеснено измерване на зони на инхибиране по метода на Бауер-Кърби от фотографски снимки.

ПУБЛИКАЦИИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Научни публикации в специализирани реферирани списания (SJR) и в списания с импакт фактор (IF):

1. Kizheva, Y. K., Rasheva, I. K., Petrova, M. N., Milosheva-Ivanova, A. V., Velkova, L. G., Dolashka, P. A., Dolashki, A. K. & Hristova, P. K. (2019). Antibacterial activity of crab haemocyanin against clinical pathogens. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 33(1), 873-880.

2. Petrova D., Yocheva L., Petrova M., Karcheva Z., Georgieva Zh., Toshkova-Yotova T., Pilarski P., & Chaneva G. (2020). Antimicrobial and antioxidant activities of microalgal extracts, *Oxidation Communications*, vol:43, issue:1, 2020, pages:103-116, ISSN (print): ISSN 0209-4541.

Научни публикации в списания без реферирание (SJR) и без импакт фактор (IF)

3. Petrova M., & Petrov Ph. (2021). "A new method for manual measurements of inhibition zones with the Bauer-Kirby disk susceptibility test", *Proceedings of the Fiftieth Jubilee Spring Conference of the Union of Bulgarian Mathematicians*, ISSN 1313-3330, pages 185-190.

УЧАСТИЯ В НАУЧНО-ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКИ ПРОЕКТИ

Работата в дисертационния труд е подкрепена чрез два докторантски научно-изследователски проекта:

- Докторантски проект по Фонд научни изследвания на Софийски университет „Св. Климент Охридски“, договор № 80-10-118/15.04.2019 г. на тема *Изследване на антиоксидантна и антимикробна активност на природни продукти от цианобактерии*;
- Докторантски проект по Фонд научни изследвания на Софийски университет „Св. Климент Охридски“, договор № 80-10-147/23.04.2020 г. на тема *Разработване на препарати от природни източници срещу фитопатогенни бактерии, причиняващи икономически значими заболявания по овоцни и зеленчукови култури*.

Други участия в проекти, непряко свързани с дисертационния труд:

- Национална научна програма „Иновативни нискокотоксични биологично активни средства за прецизна медицина (БиоАктивМед)“, Договор № Д01-217/30.11.2018, ръководител проф. Павлина Долашка;
- Национална научна програма „Здравословни храни за силна биоикономика и качество на живот“ 2018-2022 към МОН. Участие в Компонент 2: Растително здраве и безопасност в хранителните системи; Работен пакет: 2.3.3.-2: Разработване на иновативни, комплексни биопрепарати стимулиращи растежа и продукцията на растителните видове и осигуряващи защита срещу фитопатогени по икономически значими култури и Компонент 3: Качество на храните за по-качествен живот; РП 3.1 Система за оценка на качеството и функционалността на биологичните и биологично базирани продукти и храни от селскостопанските системи. Председател на изпълнителния съвет: проф. д-р Владислав Попов. РП 2-3.2: доц. Стефка Атанасова; РП3: проф. Ангел Ангелов, доц. д-р Дилияна Николова (СУ);
- Фонд научни изследвания към МОН, договор No: КП-06-Н-36-1/29.09.2020 г. на тема *Проучване на патосистемата бактериофаг-фитопатоген-растение за контрол на бактериози по икономически важни земеделски култури*. Ръководител: гл. ас. д-р Елена Шопова.

ИЗПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА

1. **Дилов, Х.** (1985). „Микроводорасли. Масово култивиране и приложение“, БАН, София.
2. **Петков, Г.** (1990). „Липиди на фотоавтотрофно култивирани микроводорасли“, дисертация, ИФР, БАН, стр. 119.
3. **Христова, П.** (2020). „Кръстосаните патогени – новите биологични опасности в растителните храни“, Университетско издателство „Св. Климент Охридски“, София.
4. **Allen, M. B., Arnon, D. J.,** (1955). "Studies on nitrogen-fixing algae. I. Growth and nitrogen fixation by *Anabaena cylindrica* Lemm." *Plant Physiol* 30:366–372
5. **Allen, M. M.** (1968). Simple Conditions For Growth Of Unicellular Blue-Green Algae On Plates 1, 2. *Journal of phycology*, 4(1), 1-4.
6. **Antoszczak, M., Popiel, K., Stefańska, J., Wietrzyk, J., Maj, E., Janczak, J., ... & Huczyński, A.** (2014). Synthesis, cytotoxicity and antibacterial activity of new esters of polyether antibiotic–salinomycin. *European journal of medicinal chemistry*, 76, 435-444.
7. **Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C., Turck, M.** (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45:439-496.
8. **Bonetta, L.** (2002). Pesticide-Parkinson link explored. *Nature medicine*, 8(10), 1050-1051.
9. **Bhadury, P., & Wright, P. C.** (2004). Exploitation of marine algae: biogenic compounds for potential antifouling applications. *Planta*, 219(4), 561-578.
10. **Bharadwaj, R., Vidya, A., Dewan, B., & Pal, A.** (2003). An in vitro study to evaluate the synergistic activity of norfloxacin and metronidazole. *Indian journal of pharmacology*, 35(4), 220.
11. **Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T.** (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
12. **Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T. L.** (2009). BLAST+: architecture and applications. *BMC bioinformatics*, 10(1), 1-9.
13. **Chaneva, G., Furnadzhieva, S., Minkova, K., Lukavsky, J.,** (2007). "Effect of light and temperature on the cyanobacterium *Arthronema africanum* - a prospective phycobiliprotein-producing strain." *J Appl Phycol*, 19: 537–544
14. **Chang, R. J., Ries, S. M., & Pataky, J. K.** (1991). Dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by practices used to produce tomato transplants. *Phytopathology*, 81(10), 1276-1281.
15. **Diao, Y., & Yang, Z.** (2014). Evaluation of morphological variation and biomass growth of *Nostoc commune* under laboratory conditions. *Journal of environmental biology*, 35(3), 485.

16. **Dubois**, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.
17. **Freire**, C., & Koifman, S. (2012). Pesticide exposure and Parkinson's disease: epidemiological evidence of association. *Neurotoxicology*, 33(5), 947-971.
18. **Ghasemi**, P. A., Jahanbazi, P., Enteshari, S., Malekpoor, F., & Hamed, B. (2010). Antimicrobial activity of some Iranian medicinal plants. *Archives of Biological Sciences*, 62(3), 633-641.
19. **Guillard**, R. R. (2005). Purification Methods for Microalgae. Algal culturing techniques, 117.
20. **Hameed**, M. A., Hassan, S. H., Mohammed, R., & Gamal, R. (2013). Isolation and characterization of antimicrobial active compounds from the cyanobacterium *Nostoc commune* Vauch. *J. Pure Appl. Microbiol*, 7, 109-116.
21. **Harizanova-Bartos**, H., & Stoyanova, Z. (2019). Impact of agriculture on soil pollution in Bulgaria. *Економика пољопривреде*, 66(2), 375-387.
22. **Hendriksen**, R. S., & Larsen, J. N. (2003). Global Salm-Surv: A global Salmonella surveillance and laboratory support project of the World Health Organization. Laboratory Protocols. Level 1 Training Course. Modified version, November 2010.
23. **Hernández**, A. F., Parrón, T., & Alarcón, R. (2011). Pesticides and asthma. *Current opinion in allergy and clinical immunology*, 11(2), 90-96.
24. **Hughes**, E. O., Gorham, P. R., & Zehnder, A. (1958). Toxicity of a unialgal culture of *Microcystis aeruginosa*. *Canadian Journal of Microbiology*, 4(3), 225-236.
25. **Jaki**, B., Orjala, J., & Sticher, O. (1999). A novel extracellular diterpenoid with antibacterial activity from the cyanobacterium *Nostoc commune*. *Journal of natural products*, 62(3), 502-503.
26. **Jaki**, B., Orjala, J., Heilmann, J., Linden, A., Vogler, B., & Sticher, O. (2000). Novel Extracellular Diterpenoids with Biological Activity from the Cyanobacterium *Nostoc commune*. *Journal of natural products*, 63(3), 339-343.
27. **Jungmann**, G. (1966). Arsenic cancer in vintagers. *Der Landarzt*, 42(28), 1244-1247.
28. **Kajiyama**, S. I., Kanzaki, H., Kawazu, K., & Kobayashi, A. (1998). Nostofungicide, an antifungal lipopeptide from the field-grown terrestrial blue-green alga *Nostoc commune*. *Tetrahedron Letters*, 39(22), 3737-3740.
29. **Kitonde**, C. K., Fidahusein, D. S., Lukhoba, C. W., & Jumba, M. M. (2013). Antimicrobial activity and phytochemical study of *vernonia glabra* (steetz) oliv. & hiern. in Kenya. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 10(1), 149-157.

30. **Kizheva, Y. K.,** Rasheva, I. K., Petrova, M. N., Milosheva-Ivanova, A. V., Velkova, L. G., Dolashka, P. A., Dolashki, A. K. & Hristova, P. K. (2019). Antibacterial activity of crab haemocyanin against clinical pathogens. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 33(1), 873-880.
31. **Koehn, F. E.,** & Carter, G. T. (2005). The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature reviews Drug discovery*, 4(3), 206-220.
32. **Lowry, O. H.** (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J biol Chem*, 193, 265-275.
33. **Maregesi, S. M.,** Pieters, L., Ngassapa, O. D., Apers, S., Vingerhoets, R., Cos, P., ... & Vlietinck, A. J. (2008). Screening of some Tanzanian medicinal plants from Bunda district for antibacterial, antifungal and antiviral activities. *Journal of ethnopharmacology*, 119(1), 58-66.
34. **Mostafalou, S.,** & Abdollahi, M. (2013). Pesticides and human chronic diseases: evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicology and applied pharmacology*, 268(2), 157-177.
35. **Najdenski, H. M.,** Gigova, L. G., Iliev, I. I., Pilarski, P. S., Lukavský, J., Tsvetkova, I. V., ... & Kussovski, V. K. (2013). Antibacterial and antifungal activities of selected microalgae and cyanobacteria. *International journal of food science & technology*, 48(7), 1533-1540.
36. **Newman, D. J.,** Cragg, G. M., & Snader, K. M. (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981– 2002. *Journal of natural products*, 66(7), 1022-1037.
37. **Petrova M.,** & Petrov Ph. (2021). “A new method for manual measurements of inhibition zones with the Bauer-Kirby disk susceptibility test”, Proceedings of the Fiftieth Jubilee Spring Conference of the Union of Bulgarian Mathematicians, ISSN 1313-3330, pages 185-190.
38. **Prieto, P.,** Pineda, M., & Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical biochemistry*, 269(2), 337-341.
39. **Ranglová, K.,** Lakatos, G. E., Manoel, J. A. C., Grivalský, T., Estrella, F. S., Fernández, F. G. A., ... & Masojídek, J. (2021). Growth, biostimulant and biopesticide activity of the MACC-1 *Chlorella* strain cultivated outdoors in inorganic medium and wastewater. *Algal Research*, 53, 102136.
40. **Rashid, B.,** Husnain, T., & Riazuddin, S. (2010). Herbicides and pesticides as potential pollutants: a global problem. In *Plant adaptation and phytoremediation* (pp. 427-447). Springer, Dordrecht.
41. **Rose, S. B.,** & Miller, R. E. (1939). Studies with the agar cup-plate method: I. A standardized agar cup-plate technique. *Journal of bacteriology*, 38(5), 525-537.

42. **Roth, F.** (1958). Über den Bronchialkrebs arsengesetzlicher Winzer. *Virchows Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin*, 331(2), 119-137.
43. **Sampaio, F. C.,** Maria do Socorro, V. P., Dias, C. S., Costa, V. C. O., Conde, N. C., & Buzalaf, M. A. (2009). In vitro antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. *Journal of ethnopharmacology*, 124(2), 289-294.
44. **Shaieb, F. A.,** Issa, A. A., & Meragaa, A. (2014). Antimicrobial activity of crude extracts of cyanobacteria *Nostoc commune* and *Spirulina platensis*. *Archives of Biomedical Sciences*, 2(2), 34-41.
45. **Shannon, E.,** & Abu-Ghannam, N. (2016). Antibacterial derivatives of marine algae: An overview of pharmacological mechanisms and applications. *Marine drugs*, 14(4), 81.
46. **Singleton, V. L.,** Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*, 299, 152-178.
47. **Staub, R.** (1961). Ernährungsphysiologisch-autökologische Untersuchungen an der planktischen Blaualge *Oscillatoria rubescens* DC. *Schweizerische Zeitschrift für Hydrologie*, 23(1), 82-198.
48. **Tamm, L.,** Thuerig, B., Apostolov, S., Blogg, H., Borgo, E., Corneo, P. E., ... & Herforth-Rahmé, J. (2022). Use of copper-based fungicides in organic agriculture in twelve European countries. *Agronomy*, 12(3), 673.
49. **Terziev, V.,** & Petkova-Georgieva, S. (2020). The Health and Safety Problems According to the Pesticides Usage in the Ecosystem. *Available at SSRN 3653283*.
50. **Thayer, K. A.,** Heindel, J. J., Bucher, J. R., & Gallo, M. A. (2012). Role of environmental *chemicals* in diabetes and obesity: a National Toxicology Program workshop review. *Environmental health perspectives*, 120(6), 779-789.
51. **Van Baarlen, P.,** Van Belkum, A., Summerbell, R. C., Crous, P. W., & Thomma, B. P. (2007). Molecular mechanisms of pathogenicity: how do pathogenic microorganisms develop cross-kingdom host jumps?. *FEMS microbiology reviews*, 31(3), 239-277.

СПИСЪК С ФИГУРИ И ТАБЛИЦИ

ТАБЛИЦИ

Табл. 1. Биохимичен състав на биомаса	15
Табл. 2. Зони на инхибиране в mm на нативен хемоцианин (EvH) от <i>E. verrucosa</i> и неговите субединици (SU1-SU5) срещу човешки патогени	44
Табл. 3. Определяне на MIC на хемоцианинови субединици от <i>E. verrucosa</i> срещу човешки патогени.....	45

ФИГУРИ

Фиг. 1. Култивиране на микроводорасловия щам (ХПВ-А1).....	10
Фиг. 2. Растежна крива на ХПВ-А1	10
Фиг. 3. Микроскопска снимка на клетки от ХПВ-А1, 40 x (Olympus DP72).....	11
Фиг. 4. PCR амплификация на ДНК от изолирани микроводорасли с универсални праймери (ITS1, ITS2 и ITS4) и специфични праймери (rbcL_F и rbcL_R).....	12
Фиг. 5. Neighbor-joining филогенетични дървета.....	13
Фиг. 6. Лиофилизирани екстракти	14
Фиг. 7. Алкохолни екстракти	14
Фиг. 8. Антимикробна активност на КС от <i>A. africanum</i> срещу избрани патогени	18
Фиг. 9. Антимикробна активност на КС от <i>A. africanum</i> срещу фитопатогени.....	19
Фиг. 10. Антибактериална активност на <i>N. commune</i> срещу <i>C. michiganensis</i>	21
Фиг. 11. Антимикробна активност на ХПВ-А1 срещу <i>Enterococcus</i> – изолат	22
Фиг. 12. Антибактериална активност на ХПВ-А1 срещу избрани фитопатогени	23
Фиг. 13. Определяне на FIC на културална среда от <i>A. africanum</i> и ХПВ-А1 срещу <i>X. euvesicatoria</i> 269p	28

Фиг. 14. Определяне на FIC на културална среда от <i>A. africanum</i> и ХПВ-А1 срещу <i>Pseudomonas</i> 32f	28
Фиг. 15. MIC на салиномицин срещу фитопатогени.....	30
Фиг. 16. Инхибиторна активност на КС и ЕкПЗ от <i>A. Africanum</i> срещу човешки патогени и антибиотик гентамицин	31
Фиг. 17. Инхибиторна активност на продукти от биомаса на <i>A. africanum</i> срещу човешки патогени и антибиотик гентамицин	32
Фиг. 18. Антимикробна активност на КС от <i>A. africanum</i> срещу фитопатогени и контрола от меден сулфат.....	33
Фиг. 19. Инхибиторна активност на КС и АЕ от <i>A. africanum</i> срещу човешки патогени и контрола гентамицин.....	34
Фиг. 20. Инхибиторна активност на КС, ЕкПЗ, ЕнПЗ на <i>N. commune</i> към човешки патогени и контрола гентамицин	35
Фиг. 21. Инхибиторна активност на продукти от биомаса на <i>N. commune</i> към човешки патогени и контрола гентамицин	36
Фиг. 22. Инхибиторна активност на продукти от биомаса на ХПВ-А1 към човешки патогени, с контрола гентамицин.....	37
Фиг. 23. Инхибиторна активност на КС от ХПВ-А1 към човешки патогени и контрола гентамицин	38
Фиг. 24. Антимикробна активност на КС от ХПВ-А1 към фитопатогени и контрола меден сулфат	39
Фиг. 25. Инхибиторна активност на антибиотиците монензин и салиномицин срещу фитопатогени и контрола меден сулфат ...	40
Фиг. 26. Сравнение на MIC на КС от <i>A. africanum</i> срещу човешки патогени и фитопатогени	41
Фиг. 27. Сравнение на MIC на КС от ХПВ-А1 срещу човешки патогени и фитопатогени	42

