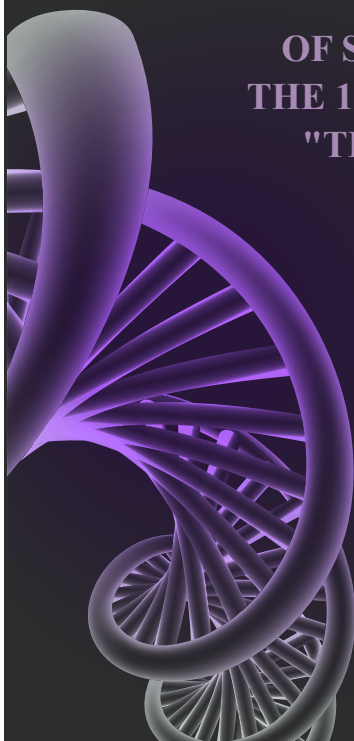


СБОРНИК
РЕЗЮМЕТА ОТ НАУЧНИ ДОКЛАДИ ОТ
18-ТА НАУЧНА КОНФЕРЕНЦИЯ
„ДОВЕРИЕ ЧРЕЗ НАУКА“
14 МАЙ 2026 Г.

SUMMARIES
OF SCIENTIFIC REPORTS FROM
THE 18TH SCIENTIFIC CONFERENCE
"TRUST THROUGH SCIENCE"
MAY 14, 2026





СБОРНИК
РЕЗЮМЕТА ОТ НАУЧНИ ДОКЛАДИ ОТ
18-ТА НАУЧНА КОНФЕРЕНЦИЯ
„ДОВЕРИЕ ЧРЕЗ НАУКА“
14 МАЙ 2026 Г.

SUMMARIES
OF SCIENTIFIC REPORTS FROM THE
18TH SCIENTIFIC CONFERENCE
"TRUST THROUGH SCIENCE"
MAY 14, 2026

Обща редакция

Център за оценка на риска по хранителната верига,
Български контактен център на EFSA

Дизайн и предпечат:

В. Евтимова

© Център за оценка на риска по хранителната верига,
Български контактен център на EFSA

София, 2026г.

ISBN 978-619-7509-20-5

Ани Георгиева
Албена Мерджанова
Апостол Апостолов

Боряна Спасова

Валя Василева
Ваня Димитрова
Виктор Наврулин
Виктория Лапрус
Виктория Монева
Владислава Дишлийска
Володимир Балатски
Вълко Нешев
Вирмантас Стунженас

Габриела Гужгулова
Галина Стоянчева
Галя Петрова
Георги Петров
Гергана Дешева
Гражина Станевичюте
Грета Найденова

Даниела Цекова
Делка Салкова
Деница Петкова
Десислава Абаджиева
Десислава Тодорова
Диана Добрева
Донка Димбарева
Драгомир Янков

Екатерина Крумова
Елена Кузова
Елена Шопова
Ели Зайова
Елисавета Кирова

Жени Митева-Сталева

Здравка Петрова
Зорница Катерова
Зорница Катерова-Ланджова

Инна Суликовска
Иво Янашков
Искрен Сергиев

Йорданка Карталска-
Татарова

Калинка Гургулова
Камелия Миладинова-
Георгиева
Катерина Захариева
Катерина Тодорова
Константина Стефанова
Койчо Коев
Красимир Коцев
Красимира Василев
Красимира Генова

Лили Добрева

Лилия Цветанова
Лиляна Бранкова
Лора Велева
Любомира Боянова
Людмила Димитрова
Людмила Йовчевска

Мария Ангелова
Мария Анелова
Мария Генева
Мария Гергинова
Мария Петрова
Марияна Георгиева
Марияна Сичанова
Мариана Панайотова-Пенчева
Мартин Илиев
Милен Богданов
Миладин Назарков
Мирена Чакърова
Михаил Миланов
Михаил Червенков

Надежда Луканова
Надежда Шукова
Надя Миткова
Невен Терзиев
Николай Спасов
Николая Велчева
Николета Атанасова

Огнян Москов

Павел Добзин
Паулина Станева
Петър Дончев
Петя Попова-Крумова
Петя Тодорова

Радослав Абрашев
Раса Бинкиене
Росица Милчева
Росица Титоренкова

Савина Стоянова
Светла Данова
Светослав Йорданов
Сейф Ал-Хаджадж
София Буковска
Станимира Арсова
Станислава Бояджиева
Станислава Георгиева
Станислава Йорданова
Стефан Бронзваер
Стефан Петров

Татяна Величкова
Теодора Асенова
Теодора Йосифова

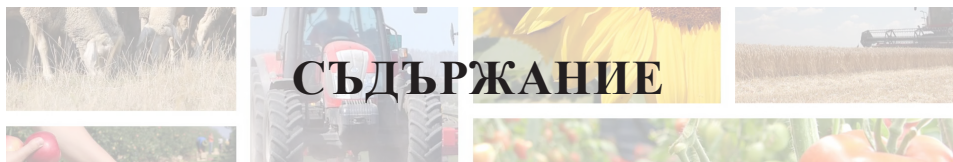
Флора Цветанова

Цвета Георгиева
Цветина Николова
Ценко Въчев

Чигдем Юркю

Юлияна Атанасова

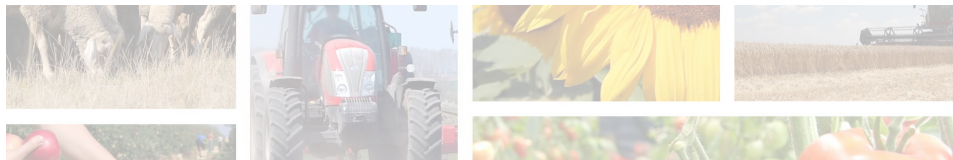
Яна Гочева



СЪДЪРЖАНИЕ

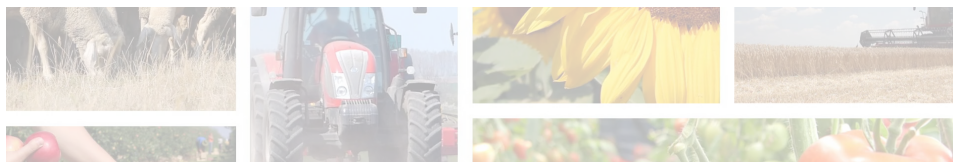
ДОКЛАДИ

1. Шап в Европа – Оценка на стратегическия риск и национална уязвимост. Пространствено моделиране и епидемиологична динамика в България (2025–2026).....	10
2. Управление на риска от микотоксини – подходи и предизвикателства.....	12
3. Необходимост от върхови научни постижения в работата на Европейския орган по безопасност на храните и готовност за регулаторна наука.....	14
4. От почвата до растенията: интегриран подход към агроecosистемното здраве и устойчиво земеделие.....	15
5. Мониторингова програма и въвеждане на мерки за ограничаване на антимикробната резистентност в България.....	17
6. Европейският закон за биотехнологиите: възможности и предизвикателства за хранителната сигурност в България.....	19
7. Мерки по дезинсекция в животновъдните обекти.....	21
8. Адаптивен отговор на халотолерантни филаментозни гъби към повишени концентрации NaCl: връзка между соли и оксидативен стрес.....	22
9. Разкриване на спермин-медираната биохимична и транскрипционна регулация на антиоксидантната защита при <i>Triticum aestivum</i> L., след инфекция с <i>Fusarium culmorum</i>	24
10. Функционалните храни като инструмент за превенция и поддържане на човешкото здраве. Модулиране на глюकोзинолатния профил на микрорастения кейл чрез UV-C прайминг на семена...26	
11. Генетично разнообразие, устойчиво ползване и опазване на критично застрашения български ендемит <i>Centranthus kelleri</i> (Stoj., Stef. & T. Georgiev) Stoj. & Stef. (Valerianaceae).....	28
12. Стопанско и медицинско значение на продуктите, получени от едногърба камила (<i>Camelus dromedarius</i> L.).....	30
13. Генетичен допинг – как мутация в миоастатиновия ген може да увеличи мускулната маса при кучета от породата Уипет.....	32
14. Приоритетни устойчиви замърсители в двучерупчести мекотели: оценка на потенциалния риск за човешкото здраве.....	34



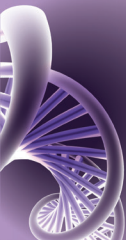
ПОСТЕРИ

1. Качество на семенните еякулати при дребни преживни като индиректен фактор за качество на храните.....37
2. Биохимичен капацитет и *in silico* анализ на липидната матрица в кокошия жълтък.....40
3. Ефект на микроразмножаването върху ензимната и неензимна антиоксидантна активност на *Physalis peruviana* L.....43
4. Влияние на креатина и креатин лизината върху *in vitro* култивирането и антиоксидантния статус на *Leontopodium alpinum*.....46
5. Метаболитни промени в *in vitro* размножена *Stevia rebaudiana* в отговор на комплекса креатин–лизинат, добавен в MS хранителна среда.....49
6. Моделиране на дилатативна кардиомиопатия с фокус върху ензимното фено- и генотипизиране.....52
7. Разпространение на вароатоза и нозематоза в различни райони на България.....55
8. Промени в хормоналните нива на два български сорта пшеница, причинени от суша – взаимодействие с мелатонин.....57
9. Размножаване на *Arnica montana* L. при използване на агар-втвърдена хранителна среда и биореактор с временно потапяне...60
10. Кинетично моделиране и сравнителна оценка на производството на млечна киселина от агроиндустриални отпадъци.....63
11. Лигноцелулозни отпадъци като устойчив източник на ферментируеми захари.....67
12. Дигитален анализ на семена в системата за устойчиво управление на растителните генетични ресурси в България.....71
13. Антиоксидантен потенциал и общо количество полифеноли в слънчогледови люспи.....73
14. Проучване на антибактериалния потенциал на водната бактериална съобщност при култивирането на нилска тилапия и



босилек в аквапонна система.....	76
15. <i>Potentilla reptans</i> – потенциално антиоксидантно действие върху яйцеклетките.....	79
16. Анализи на фитосанитарния риск от приоритетните вредители по растенията.....	82
17. Екологосъобразен синтез на наночастици от хематит чрез екстракт от семена на нахут.....	85
18. Нови антибактериални вещества, произведени от антарктически гъби.....	88
19. Изследване антифунгална активност на щамове <i>Lactobacillus</i> от ендометриален микробиом.....	91
20. Молекулярни инструменти за диагностициране на стомашно-чревни и белодробни нематодни инфекции по диви животни.....	94
21. Ефект на прайминга на семена с UV-C върху растежните параметри и количеството осмолити в микрорастения кейл.....	96
22. Промени в съдържанието на полиамини в българска пшеница сорт Фермер, предизвикани от засушаване и мелатонин.....	98
23. Модулиращ ефект от кореново прилагане на мелатонин преди и след засушаване върху нивата на полиамини в млади пшенични растения.....	101
24. Ферментационни продукти на България – традиция и нови технологии за функционални продукти.....	104
25. Проверка на способността на симулационната програма AN-SYS Fluent да прогнозира времето на фазов преход при охлаждане на PCM тип парафин.....	108
26. Нетуберкулозни микобактерии в хранителната верига – източници и риск.....	111
27. Пчелни продукти – информиран и разумен избор.....	114
28. Когато имунитетът се обърне срещу организма: биология на цитокиновата буря.....	116
29. Потенциалът на микроводораслите от род <i>Scenedesmus</i> за приложение в животновъдството.....	118





ДОКЛАДИ



Шап в Европа – Оценка на стратегическия риск и национална уязвимост. Пространствено моделиране и епидемиологична динамика в България (2025-2026)

Койчо Коев, Габриела Гужгулова

Катедра „Ветеринарна микробиология, инфекциозни и паразитни болести“, Ветеринарномедицински факултет, Тракийски университет, Стара Загора, България

Център за оценка на риска по хранителната верига, София

Шапът (Foot-and-Mouth Disease, FMD) остава едноотнай-контагиозните трансгранични вирусни заболявания при чифтокопитните животни и продължава да представлява сериозна заплаха за животновъдството, търговията и продоволствената сигурност в глобален мащаб. През периода 2025–2026 г. епизоотичната ситуация в Европа се характеризира с повишена динамика и разширяване на географския обхват на заболяването, включително регистриране на огнища в региони с висок ветеринарномедицински контрол.

Настоящото изследване има за цел да извърши пространствено-епидемиологичен анализ на риска от разпространение на шап в Европа с акцент върху потенциалния риск за България. Използвани са данни от системата ADIS, информация за животновъдните обекти и геопространствени данни, обработени чрез QGIS и алгоритми за пространствен анализ. Приложени са методи за геокодиране, клъстерен анализ (DBSCAN) и експоненциален модел за оценка на риска в зависимост от разстоянието до огнищата.

Резултатите показват наличие на ясно обособени рискови клъстери и региони с повишена епизоотична уязвимост, особено в зони с интензивни транспортни връзки и висока плътност на възприемчиви животни. Анализът потвърждава, че България се намира в близост до потенциални епизоотологични коридори, което налага поддържане на висок preparedness капацитет, активен надзор и засилени мерки за биосигурност.

Получените резултати демонстрират значението на пространственото моделиране като инструмент за ранна оценка на риска, оптимизиране на контролните мерки и стратегическо управление на трансграничните

инфекции в контекста на съвременната ветеринарна епидемиология и концепцията One Health

Ключови думи: *Foot-and-Mouth Disease (FMD), пространствен анализ, епидемиологично моделиране, оценка на риска, ADIS, DBSCAN, геопропространствен анализ, клъстерен анализ*

Foot-and-Mouth Disease in Europe – Assessment of Strategic Risk and National Vulnerability: Spatial Modeling and Epidemiological Dynamics in Bulgaria (2025–2026)

Koicho Koev, Gabriela V. Goujgoulova

Department of Veterinary Microbiology, Infectious and Parasitic Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Trakia University, Stara Zagora, Bulgaria, Risk Assessment Center on Food Chain, Sofia

Foot-and-Mouth Disease (FMD) remains one of the most contagious transboundary viral diseases affecting cloven-hoofed animals and continues to pose a serious threat to livestock production, international trade, and food security worldwide. During the period 2025–2026, the epizootic situation in Europe has been characterized by increased dynamics and expansion of the geographical distribution of the disease, including outbreaks in regions with traditionally high veterinary control standards.

The aim of the present study was to perform a spatial-epidemiological risk assessment of FMD spread in Europe, with particular focus on the potential risk for Bulgaria. Data from the Animal Disease Information System (ADIS), livestock holding databases, and geospatial datasets were integrated and analyzed using QGIS and spatial analytical algorithms. Geocoding procedures, DBSCAN cluster analysis, and an exponential distance-based risk model were applied to evaluate the spatial distribution of the disease risk.

The results identified distinct high-risk clusters and regions with increased epizootic vulnerability, particularly in areas characterized by intensive transportation networks and high densities of susceptible animal populations. The analysis confirmed that Bulgaria is located near potential epizootological corridors, emphasizing the necessity for maintaining high preparedness capacity, active surveillance, and strengthened biosecurity measures.

The findings highlight the potential value of spatial modeling as a valuable

tool for early risk assessment, optimization of control strategies, and strategic management of transboundary animal diseases within the framework of modern veterinary epidemiology and the One Health concept.

Key words: *Foot-and-Mouth Disease (FMD), spatial analysis, epidemiological modeling, risk assessment, ADIS, DBSCAN, preparedness, geospatial analysis, cluster analysis*

Управление на риска от микотоксини – подходи и предизвикателства

Йорданка Карталска-Татарова, Паулина Станева
Факултет по растителна защита и агроекология, Аграрен
Университет, Пловдив

В условията на динамични и бързо променящи се климатични фактори, рискът от пролиферация на микотоксигенни гъби и последващата продукция на вторични метаболити при зърнено-житните и техническите култури придобива ясно изразен регионален характер. В България, фузариозата по класа (*Fusarium head blight*) представлява основна икономическа заплаха за качеството и безопасността на зърното, характеризираща се с комплексен и еволюиращ токсикологичен профил. Видовете от род *Fusarium* и род *Aspergillus* продуцират широк спектър от микотоксини, включително трихотецени (деоксиниваленол, ниваленол, Т-2 и НТ-2 токсини), зеараленон (ZEN), фумонизини (FUM), афлатоксини и охратоксини. Анализът на проби от царевича разкрива общи концентрации на афлатоксини до 176 µg/kg и нива на охратоксини до 45.8 µg/kg, като и в двата случая се превишават максимално допустимите граници, определени от Регламент (ЕС) 2023/915. Настоящото изследване има за цел разработването на прогнозен модел за управление на риска от микотоксини в България. Подходът интегрира ранна идентификация на патогените и оценка на токсигенния риск чрез регионално вземане на проби, PCR-базирано хемотипизиране на *Fusarium spp.* и молекулярен скрининг на потенциално афлатоксигенни и охратоксигенни изолати.

Ключови думи: *микотоксини; Fusarium spp.; Aspergillus spp. управление на риска, безопасност на храните*



Mycotoxin risk management – approaches and challenges

Yordanka Kartalska-Tatarova, Paulina Staneva

*Faculty of Plant Protection and Agroecology,
Agricultural University, Plovdiv*

Under dynamic, rapidly changing climatic conditions, the proliferation of mycotoxigenic fungi and the subsequent synthesis of secondary metabolites in cereal and industrial crops have exhibited a distinct regional pattern. In Bulgaria, *Fusarium Head Blight* (FHB) poses a critical economic threat to grain quality and safety and is characterized by a complex, evolving toxicological profile. Species in the *Fusarium* and *Aspergillus* genera produce a broad spectrum of mycotoxins, notably trichothecenes (deoxynivalenol, nivalenol, T-2, and HT-2 toxins), zearalenone (ZEN), fumonisins (FUM), aflatoxins, and ochratoxins. Analysis of maize samples has identified total aflatoxin concentrations of up to 176 µg/kg and ochratoxin levels of up to 45.8 µg/kg, both of which significantly exceed the maximum levels established by Regulation (EU) 2023/915. This study aims to establish a predictive framework for mycotoxin risk management in Bulgaria by integrating early pathogen detection with regional sampling, PCR-based chemotyping of *Fusarium spp.*, and molecular screening of potentially aflatoxigenic and ochratoxigenic isolates.

Key words: *mycotoxins, Fusarium spp., Aspergillus spp., risk management, food safety*



EFSA needs for scientific excellent and regulatory readiness

Stephan Bronzwaer
European Food Safety Authority

Food and feed safety risk assessment is impacted by rapid technological innovation, evolving exposure patterns and systemic hazards. To inform its next strategic cycle, the European Food Safety Authority (EFSA) is mapping scientific needs to deliver timely, transparent and robust advice, structured around five regulatory science pathways: innovation; methodological and technical advances; One Health; preparedness; and effective communication.

Maintaining EU competitiveness requires adapting assessment frameworks to novel technologies (e.g., precision fermentation and New Genomic Techniques). High-impact needs include accelerating New Approach Methodologies (NAMs), multiomics integration and advancing exposure science to increase efficiency, strengthen evidence and progressively reduce animal testing.

A One Health approach is needed to address cross-sectoral risks through structured cooperation with EU agencies and Member States, including priorities on antimicrobial resistance, foodborne outbreaks, integrated surveillance, animal welfare, microbiome science and research engagement. Preparedness requires systems thinking, long-term perspectives and coordinated governance, supported by horizon scanning, predictive modelling and AI enabled foresight, while keeping expert judgement human-controlled.

EFSA aims to strengthen audience-first risk communication by integrating social science earlier in assessment, expanding evidence generation and improving detection and response to false or misleading information. Digital transformation, streamlined data processing and strengthened partnerships will help to shorten assessment timelines without compromising scientific quality, enhance transparency and stakeholder engagement, and increase the resilience of Europe's food safety system in the face of emerging, systemic risks.

Key words: *regulatory science; food and feed safety; One Health; preparedness; risk communication*

От почвата до растенията: интегриран подход към агроекосистемното здраве и устойчиво земеделие

Миладин Назарков

Институт по почвознание, агротехнологии и защита на растенията „Н. Пушкиarov“

През стопанската 2025 година в опитна база „Божурище“ на ИПАЗР „Н. Пушкиarov“, Софийско е проведен полски опит с предкултура за зелено торене и на основна - царевица за зърно. Изпитани са различни варианти на торене, с минерални и органични торове. Изследвани са промените в основните почвени свойства на Излужена Смолница (Haplic Vertisols), която се характеризира с мощен до един метър дълбочина, слабо до средно глинест черен хумусен хоризонт.

Резултатите показват, че комбинираното торене подобрява хранителния режим на почвата и увеличава активността и числеността на почвените микроорганизми. Установено е също, че се повишава биологичната активност на почвата в началото на вегетацията на царевицата, изразена чрез по-висока продукция на CO_2 и въглерод.

Най-висок добив зърно царевица е получен във вариант Т₁ (минерален тор $\text{N}_{11}\text{P}_8 + 30 \text{ kg. da}^{-1}$ органичен тор от растителен произход).

Механичната обработка на почвата допринася за намаляване на заплевеляването.

Установено е, че емисиите на CO_2 и N_2O зависят от метеорологичните условия, почвените свойства, биологичните процеси и прилаганите агротехнически практики, като най-силно влияние оказват видът и нормата на използваните торове.

Получените резултати от опита доказват, че прехода от чисто химическо към интегрирано органо-минерално земеделие, не е екологичен компромис, а икономическо предимство.

Ключови думи: *неполивна царевица; органично и минерално торене; биологична активност; добив зърно*

From soil to plants: an integrated approach to agroecosystem health and sustainable agriculture

Miladin Nazarkov

Institute of soil science, agro technologies and plant protection “Nikola Poushkarov”

During the 2025 agricultural year, a field experiment was conducted at the Bozhurishte Experimental Station of the Institute of Soil Science, Agrotechnologies and Plant Protection “N. Poushkarov”, Sofia region. The study included a green manure precursor crop and a main crop—maize for grain. Different fertilization treatments, including mineral and organic fertilizers, were tested. Changes in the main soil properties of Leached Smolnitsa (Haplic Vertisols) were investigated. This soil is characterized by a deep (up to 1 meter) black humus horizon that is slightly to moderately clayey.

The results show that combined fertilization improves the soil nutrient regime and increases the activity and abundance of soil microorganisms. It was also found that soil biological activity increases at the beginning of the maize growing season, as indicated by higher CO₂ production and carbon content.

The highest grain yield of maize was obtained in treatment T₁ (mineral fertilizer N₁₁P₈ + 30 kg da⁻¹ organic fertilizer of plant origin).

Mechanical soil cultivation helped reduce weed infestation.

It was established that CO₂ and N₂O emissions depend on meteorological conditions, soil properties, biological processes, and applied agricultural practices, with the strongest influence exerted by the type and rate of fertilizers used.

The results of the experiment demonstrate that the transition from purely chemical to integrated organo-mineral farming is not an ecological compromise, but rather an economic advantage.

Key words: *rainfed maize; organic and mineral fertilization; biological activity; grain yield*

Мониторингова програма и въвеждане на мерки за ограничаване на антимикробната резистентност в България

Михаил Миланов

Национален Център по Безопасност на Храни, Национален
диагностичен научноизследователски ветеринарномедицински
институт

Антимикробната резистентност (АМР) представлява значителна глобална заплаха за здравето на хората и животните. АМР се определя като намалена или загубена способност на антимикробния агент да инхибира растежа на бактерия. Това компрометира ефективността на антимикробните средства при лечението на инфекции, причинени от резистентни микроорганизми.

Мониторингът на АМР включва специфично и непрекъснато събиране, анализ и докладване на данни. Тези данни спомагат за вземането на информирани решения, основани на доказателства, и подпомагат разработването на подходящи стратегии и действия за управление на антимикробната резистентност на ниво ЕС. НЦБХ към НДНИВМИ изпълнява ключова роля в изпълнението на програмата за мониторинг на АМР при животни и храни в България. Мониторингът се фокусира върху зоонозни и коменсални микроорганизми в животински популации, на които потребителят е най-вероятно да бъде изложен чрез производни от тях хранителни продукти. Също така той се фокусира върху целеви антимикробни средства, подбрани поради тяхната значимост за хуманната терапия – по-специално критично важни антимикробни средства с най-висок приоритет (hpCIAs) – и тяхната епидемиологична значимост, предоставяйки по-ясна представа за основните механизми на резистентност.

В началото на 2026 г. бе приета Национална програма за действие срещу антимикробната резистентност (АМР) в България. Тя представлява първата цялостна рамка в страната за справяне с този глобален здравен проблем чрез координирани действия в хуманната медицина, ветеринарната медицина и околната среда. Програмата е изградена върху концепцията на СЗО „Едно здраве“ (One Health), според която здравето на хората, животните и екосистемите е тясно свързано. Основната цел е ограничаване на АМР чрез намаляване на общата употреба на антимикробни средства и запазване на тяхната

ефективност. Осъществяването на Националната програма изисква координирани действия в областта на хуманната и ветеринарна медицина, хигиената на храненето, на опазването на околната среда и водите, но също и достатъчни човешки и финансови ресурси. Нейното изпълнение ще позволи ограничаване на АМР, оптимално прилагане на антибиотиците при хора и животни и трайно подобряване на здравните показатели.



Monitoring program and introduction of measures to limit antimicrobial resistance in Bulgaria

Mihail Milanov

National Centre for Food Safety, National Diagnostic and Research Veterinary Institute

Antimicrobial resistance (AMR) is a significant global threat to both human and animal health. AMR is defined as the reduced or lost ability of an antimicrobial agent to inhibit bacterial growth. This compromises the effectiveness of antimicrobials in treating infections caused by resistant microorganisms.

Monitoring AMR involves the specific and continuous collection, analysis, and reporting of data. This data facilitates evidence-based decision-making and supports the development of appropriate strategies and actions for managing antimicrobial resistance at the EU level. The National Center for Food Safety (NCFS) at the National Diagnostic and Research Veterinary Medical Institute (NDRVMI) plays a key role in implementing the AMR monitoring program for animals and food in Bulgaria. Monitoring focuses on zoonotic and commensal microorganisms in animal populations to which consumers are most likely to be exposed through food products. It also focuses on targeted antimicrobials selected for their importance in human therapy—specifically highest priority critically important antimicrobials (hpCIAs)—and their epidemiological significance, providing a clearer picture of the underlying mechanisms of resistance.

At the beginning of 2026, a National Action Plan against Antimicrobial Resistance (AMR) was adopted in Bulgaria. It represents the country's first comprehensive framework for addressing this global health problem through coordinated actions in human medicine, veterinary medicine, and

the environment. The program is built on the WHO „One Health“ concept, which recognizes that the health of people, animals, and ecosystems is closely linked. The main goal is to limit AMR by reducing the overall use of antimicrobials and preserving their effectiveness. Implementing the National Program requires coordinated actions in the fields of human and veterinary medicine, food hygiene, environmental and water protection, as well as sufficient human and financial resources. Its implementation will allow for the reduction of AMR, the optimal use of antibiotics in humans and animals, and a lasting improvement in health indicators.

Европейският закон за биотехнологиите: възможности и предизвикателства за хранителната сигурност в България

Цвета Георгиева, Донка Димбарева, Елена Кузова, Красимира Василев, Станимира Арсова

Национален център по общественото здраве и анализи

Европейският закон за биотехнологиите (EU Biotech Act), чийто първи етап бе предложен в края на 2025 г., цели да превърне Европа в глобален лидер в сектора чрез ускоряване на пътя от лабораторията до пазара. Основни стълбове и цели на новия закон включват: опростяване на регулациите: намаляване на бюрокрацията и ускоряване на пътя на иновациите от лабораторията до пазара; стимулиране на инвестициите: създаване на механизми за по-лесен достъп до финансиране за стартапи и малки и средни предприятия (МСП) в сектора; фокус върху здравеопазването: първата фаза на закона (края на 2025 г.) се насочва върху клинични изпитвания, клетъчни и генни терапии; биосигурността: въвеждане на механизми за контрол върху продукти с двойна употреба и предотвратяване на злоупотреби с биотехнологии; регулаторните „пясъчници“ (Sandboxes) представляват възможност за тестване на нови технологии в контролирана среда с облекчени правила. За България новата законодателна рамка отваря значителни хоризонти, но и поставя сериозни изисквания за адаптация. По отношение на хранителната сигурност за България този акт носи специфични възможности и предизвикателства: Възможности - иновации и конкурентоспособност; подкрепа за МСП; достъп до финансиране; устойчивост. Предизвикателствата

могат да се конкретизират в следните категории: обществена съпротива и скептицизъм; регулаторна сложност. Следващи стъпки: Предложението на ЕС за 2025 г. в момента преминава през законодателния процес в Европейския парламент и Съвета, като се очаква втора фаза (обхващаща земеделието и енергетиката) през третото тримесечие на 2026 г.

Ключови думи: *биотехнологии, законодателство*

The European Biotechnology Act: Opportunities and Challenges for Food Security in Bulgaria

Tzveta Georgieva, Donka Dimbareva, Elena Kuzova,

Krasimira Vasileva, Stanimira Arsova

National Center of Public Health and Analyses

The EU Biotech Act, the first phase of which was proposed at the end of 2025, aims to make Europe a global leader in the sector by accelerating the path from the laboratory to the market. The main pillars and objectives of the new law include: simplifying regulations: reducing bureaucracy and accelerating the path of innovation from the laboratory to the market; stimulating investment: creating mechanisms for easier access to financing for startups and small and medium-sized enterprises (SMEs) in the sector; focusing on healthcare: the first phase of the law (end of 2025) focuses on clinical trials, cell and gene therapies; biosecurity: introducing mechanisms for controlling dual-use products and preventing misuse of biotechnology; regulatory “sandboxes” represent an opportunity to test new technologies in a controlled environment with relaxed rules. For Bulgaria, the new legislative framework opens up significant horizons, but also sets serious requirements for adaptation. In terms of food security for Bulgaria, this act brings specific opportunities and challenges: Opportunities - innovation and competitiveness; support for SMEs; access to finance; sustainability. The challenges can be specified in the following categories: public resistance and skepticism; regulatory complexity. Next steps: The EU proposal for 2025 is currently going through the legislative process in the European Parliament and the Council, with a second phase (covering agriculture and energy) expected in the third quarter of 2026.

Key words: *biotechnology, regulation*



Мерки по дезинсекция в животновъдните обекти

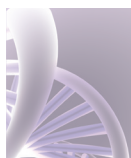
Надя Миткова, София Буковска

Национален център по заразни и паразитни болести

В регистъра на разрешените биоциди в България са включени общо 104 продукта за контрол насекоми (мухи, мравки, хлебарки) и кърлежи (кокошинки), с област на приложение в животновъдни обекти и торища. Настоящият доклад представя систематизиран преглед на продуктите въз основа на клас активни вещества, вид формулация, стадий от развитието на целевия вид вредител и категория на потребителите (масова и/или професионална). За някои от активните вещества са посочени специфични изисквания или ограничения при употреба, а за други данни за ефективност от лабораторни изпитвания по акредитирани методи.

Ефективният контрол на вредителите в животновъдните ферми изисква интегриран подход, в който съществен елемент е провеждането на текущ мониторинг. Ето защо, част от този доклад разглежда и практични средства и инструменти за ранно откриване и проследяване на динамиката при числеността на насекомите и кърлежите.

Ключови думи: *животновъдни обекти, биоциди, мониторинг*



Insect control in animal farms

Nadya Mitkova, Sofia Bukovska

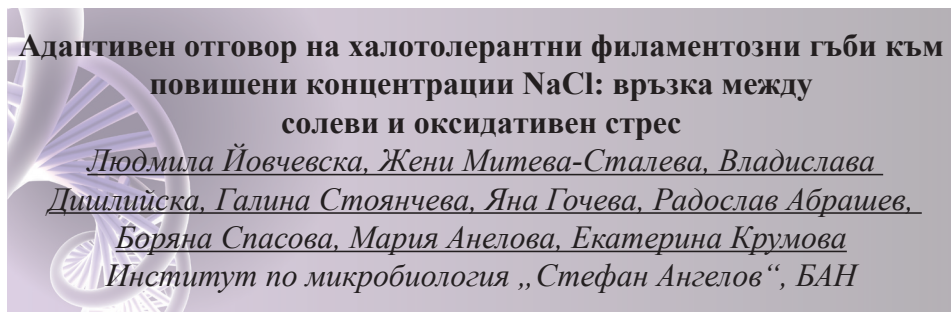
National Centre of Infectious and Parasitic Diseases

The register of authorised biocides in Bulgaria includes a total of 104 products for controlling insects (flies, ants, cockroaches) and ticks (red mites), with a field of application in livestock facilities and manure pits. This report presents a systematic review of the products based on the class of active substances, type of formulation, stage of development of the target pest, and category of users (mass and/or professional). For some of the active substances, specific requirements or restrictions on use are indicated, while for others, data on biological efficacy from laboratory tests

using accredited methods are provided.

Effective pest control on livestock farms requires an integrated approach, with ongoing monitoring being an essential element. Therefore, this report also examines practical tools for early detection and monitoring of trends in insect and tick populations.

Key words: *animal farms, biocides, monitoring*



Адаптивен отговор на халотолерантни филаментозни гъби към повишени концентрации NaCl: връзка между соли и оксидативен стрес

Людмила Йовчевска, Жени Митева-Сталева, Владислава Дишлийска, Галина Стоянчева, Яна Гочева, Радослав Абрашев, Боряна Спасова, Мария Анелова, Екатерина Крумова
Институт по микробиология „Стефан Ангелов“, БАН

Проучването на екстремофилните микроорганизми привлича все по-значителен научен интерес през последните години. Халофилните представители на тази група се характеризират със способността си да преживяват и да се размножават при високи концентрации на NaCl, като при някои от тях наличието на сол е задължително условие за нормалното им развитие. Микроорганизмите, които могат да се развиват оптимално при въздействие на повече от един екстремален фактор на средата, се определят като полиекстремофили. Техният толеранс към сол и специфичните им изисквания са обусловени от редица екологични параметри, сред които температура, pH и състав на хранителната среда.

Основен мотив за изследването на тези организми е разкриването на механизмите, чрез които те се адаптират към стресови въздействия, произтичащи от неблагоприятни условия на средата. В рамките на настоящото изследване са използвани гъбични щамове, изолирани от засолени почви в района на крайбрежни езера по българското Черноморие. Анализирани са ефектите на повишени концентрации на натриев хлорид върху растежните характеристики, морфологичните особености и физиологичното състояние на моделните щамове.

С цел изясняване на взаимовръзката между солевия и оксидативния

стрес са проследени измененията в клетъчни маркери на оксидативно увреждане, включително нивата на окислени протеини, степента на липидна пероксидация и съдържанието на резервни въглехидрати в изследваниятам. Допълнително е оценена ролята на антиоксидантните ензимни системи като част от адаптивния отговор на халотолерантния стрес към повишена концентрация на NaCl.

Ключови думи: *солеви стрес, оксидативен стрес, халотолерантни филаментозни гъби*

Adaptive Responses of Halotolerant Fungal Strains to Elevated NaCl Concentrations: Links Between Salt and Oxidative Stress

Lyudmila Yovchevska, Jeny Miteva-Staleva, Vladislava Dishliyska, Galina Stoyancheva, Yana Gocheva, Radoslav Abrashev, Boryana Spasova, Maria Angelova and Ekaterina Krumova
The Stephan Angeloff Institute of Microbiology

The study of extremophilic microorganisms has attracted increasing scientific interest in recent years. Halophilic microorganisms, as a subgroup of extremophiles, are characterized by their ability to survive and proliferate at elevated NaCl concentrations, with some species requiring high salinity as an essential condition for their normal development. Microorganisms capable of optimal growth under the influence of multiple extreme environmental factors are defined as polyextremophiles. Their salt tolerance and specific growth requirements depend on various environmental parameters, including temperature, pH, and nutrient medium composition. A major objective in investigating these organisms is to elucidate the adaptive mechanisms that enable them to withstand stress arising from harsh environmental conditions. In the present study, fungal strains isolated from saline soils surrounding coastal lakes along the Bulgarian Black Sea region were employed. The effects of increased sodium chloride concentrations on growth characteristics, morphological features, and physiological status of the model strains were examined.

To clarify the relationship between salt stress and oxidative stress, alterations in cellular biomarkers of oxidative damage were assessed, including levels of oxidatively modified proteins, lipid peroxidation, and reserve carbohydrate content in the studied strain. Furthermore, the involvement

of antioxidant enzyme defense systems in the adaptive response of the halotolerant strain to elevated NaCl concentrations was investigated.

Key words: *salt stress, oxidative stress, halotolerant filamentous fungi*

Разкриване на спермин-медираната биохимична и транскрипционна регулация на антиоксидантната защита при *Triticum aestivum* L., след инфекция с *Fusarium culmorum*

Цветина Николова, Десислава Тодорова, Искрен Сергиев, Зорница

Катерова, Елена Шопова, Лиляна Бранкова,

Ценко Въчев, Иво Янашков

Институт по физиология на растенията и генетика, Българска академия на науките

Почвеният патоген *Fusarium culmorum*, който причинява оксидативен стрес чрез свръхнатрупване на реактивни кислородни видове (ROS), представлява нарастваща заплаха за продуктивността на зимната пшеница (*Triticum aestivum* L.). Чувствителността на растенията често се определя от ефективността на тяхната сложна антиоксидантна защитна система, която поддържа редокс хомеостазата. Екзогенното прилагане на тетраамин спермин (Spm) би могло да осигури устойчив начин за „предварително програмиране“ на молекулярния механизъм на растението за повишена толерантност, тъй като синтетичните фунгициди са ограничени от международни разпоредби. Това проучване запълва ключова празнина в знанията в молекулярното разбиране на полиамин-медираната защита, като изследва регулаторните взаимовръзки между пре-третирането със спермин и антиоксидантната система. Нашите резултати предоставят задълбочена картина на клетъчната стабилност при инфекция чрез проследяване на физиологични маркери като водороден пероксид, изтичане на електролити и малондиалдехид (MDA) в допълнение към съдържанието на осмолити и пролин. Освен това, представяме информация за ензимната активност на глутатион редуктазата (GR), глутатион-S-трансферазата (GST), каталазата (CAT), пероксидазата (POX) и супероксид дисмутазата (SOD). Тези биохимични находки са корелирани с относителната експресия на свързани гени, включително TaCATA, TaCAT3, Ta-POD1, TaGPX, TaGR и различни TaSOD изоформи. Накрая, тази работа изяснява как предварителното третиране със спермин улеснява по-стабилна защитна реакция срещу

F. culmorum.

Благодарности: Изследванията са проведени с финансовата подкрепа на ФНИ по договор КП-06-Н86/6 от 06 декември 2024 г.

Ключови думи: *предварително третиране, Triticum aestivum, Fusarium culmorum, антиоксидантна защита, експресия на гени*

Understanding the Spermine-Mediated Biochemical and Transcriptional Regulation of Antioxidant Defense in *Triticum aestivum* L. Infected with *Fusarium culmorum*

Tsvetina Nikolova, Dessislava Todorova, Iskren Sergiev, Zornitsa Katerova, Elena Shopova, Lilyana Brankova, Tzenko Vachev, Ivo Yanashkov

Institute of Plant Physiology and Genetics, Bulgarian Academy of Sciences

The soil-borne pathogen *Fusarium culmorum*, which causes a harmful “respiratory bursts” and oxidative stress by over-accumulating reactive oxygen species (ROS), is posing a growing threat to the productivity of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). The plants susceptibility is frequently determined by the effectiveness of its complex antioxidant defence system, which maintains redox homeostasis. Exogenous priming with tetraamine spermine (Spm) could provide a sustainable way to “pre-program” the plant’s molecular machinery for increased tolerance as synthetic fungicides are restricted by international regulations. This study fills a crucial knowledge gap in the molecular understanding of polyamine-mediated defence by examining the regulatory crosstalk between Spm-priming and the antioxidant system. Our results provide a thorough picture of cellular stability under infection by tracking physiological markers like hydrogen peroxide, electrolyte leakage, and malondialdehyde (MDA) in addition to osmolyte and proline content. Furthermore, we present comprehensive information about the enzymatic activities of glutathione reductase (GR), glutathione-S-transferase (GST), catalase (CAT), peroxidase (POX), and superoxide dismutase (SOD). These biochemical findings are correlated with the relative expression of associated genes, including TaCATA, TaCAT3, Ta-POD1, TaGPX, TaGR, and various TaSOD isoforms. Finally, this work clarifies how Spm-priming facilitates a more robust defense response against *F. culmorum*.

Acknowledgements: This research was supported by the Bulgarian National

Key words: *priming, Triticum aestivum, Fusarium culmorum, antioxidant defence, gene expression*

Функционалните храни като инструмент за превенция и поддържане на човешкото здраве. Модулиране на глюкозинолатния профил на микрорастения кейл, чрез UV-C прайминг на семена

Лиляна Бранкова¹, Елена Шопова¹, Милен Богданов², Деница Петкова², Зорница Катерова-Ланджова¹, Людмила Димитрова¹, Савина Стоянова², Десислава Тодорова¹

¹ Институт по физиология на растенията и генетика, БАН
² СУ „Св. Климент Охридски“, Факултет по химия и фармация

През последните десетилетия храната се възприема не само като източник на енергия и основни хранителни вещества, но и като фактор за поддържане на добро здраве, превенция на заболявания и подобряване на качеството на живот. В този контекст нараства интересът към т.нар. функционални храни – продукти, които съдържат биологично активни вещества с доказан положителен ефект върху физиологичните процеси в човешкия организъм. Те могат да подобрят метаболитните процеси и имунния отговор, както и да понижат риска от хронични заболявания – диабет, сърдечно-съдови заболявания, рак. Кейлът (*Brassica oleracea* var. *acephala*) е ярък пример за функционална храна със значителен фитохимичен потенциал. Той се отличава с висока хранителна стойност и богато съдържание на биоактивни вещества, сред които глюкозинолати, полифеноли, каротеноиди – съединения с доказани антиоксидантни, противовъзпалителни и антитуморни свойства. Приложението на елиситори – фактори, които стимулират естествения защитен потенциал на растенията – представлява екологично устойчив подход за моделиране на биосинтеза на ценни метаболити. Хроматографските анализи показват, че еднократно облъчване на семената с UV-C светлина предизвиква значителни промени в съдържанието на глюкозинолати в микрорастения кейл от различни сортове. Резултатите предполагат, че използването на

UV-C светлина като елиситор е удачен подход за целенасочен синтез на вторични метаболити с потенциална полза за здравето на човека. Благодарности: Изследването е финансирано от Фонд „Научни изследвания“ към Министерството на образованието и науката (Договор номер КП-06-Н96/5 9.12.25).

Ключови думи: функционални храни, глюкозинолати, фитохимикали, кейл, микрорастения

Functional foods as a tool for prevention and maintenance of human health. Modulation of glucosinolate profile of kale microgreens via UV-C seed priming

Liliana Brankova¹, Elena Shopova¹, Milen Bogdanov², Denitsa Petkova², Zornitsa Katerova-Landzhova¹, Lyudmila Dimitrova¹, Savina Stoyanova², Desislava Todorova¹

1 Institute of Plant Physiology and Genetics, BAS

2 Sofia University “St. Kliment Ohridski”, Faculty of Chemistry and Pharmacy

In recent decades, food has come to be recognized not merely as a source of energy and essential nutrients but also as a key factor in maintaining good health, preventing disease, and improving quality of life. Consequently, there has been growing interest in functional foods – products enriched with biologically active compounds with proven beneficial effects on human physiological functions. These foods can support metabolic activity, strengthen immune function, and lower the risk of chronic conditions, such as diabetes, cardiovascular disease, and cancer. Kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) is a prominent example of a functional food with considerable phytochemical potential. It possesses high nutritional value and is rich in bioactive constituents such as glucosinolates, polyphenols, and carotenoids, which are associated with antioxidant, anti-inflammatory, and anticancer activities. The application of elicitors as inducers of plant defence pathways offers an environmentally sustainable approach to modulate the biosynthesis of valuable metabolites. Chromatographic analyses have demonstrated that a single exposure of seeds to UV-C irradiation leads to alterations in the glucosinolate levels of kale microgreens of different cultivars. These findings indicate that UV-C seed priming may serve as an

effective tool for the targeted modulation of secondary metabolites with potential health-promoting effects.

Acknowledgments. This research was funded by the National Science Fund, Ministry of Education and Science (grant number KP-06-N96/5 9.12.25).

Key words: *functional foods, glucosinolates, phytochemicals, kale, microgreens*

Генетично разнообразие, устойчиво ползване и опазване на критично застрашения български ендемит *Centranthus kelleri* (Stoj., Stef. & T. Georgiev) Stoj. & Stef. (Valerianaceae)

Галя Петрова, Стефан Петров
Медицински университет, София

Centranthus kelleri (Stoj., Stef. & T. Georgiev) Stoj. & Stef. (Valerianaceae) е критично застрашен български ендемит, включен в Червената книга на Република България. Двете му единствени находища попадат в границите на Национален парк „Пирин“ и Природен парк „Врачански Балкан“ и са под закрилата на Европейската екологична мрежа НАТУРА 2000. Въпреки това, настъпващите все по-бързо глобални изменения в климата са сред водещите рискове за оцеляването на този уникален растителен вид. Кризата с опрашителите допълнително задълбочава проблема с опазването на *Centranthus kelleri*. От друга страна, отчитайки богатото съдържание на ключови вторични метаболити и фармацевтичния потенциал на вида, ние проведохме молекулярни анализи за изучаване на таксономичните и микроморфологични характеристики на вида и за охарактеризиране състоянието на наличните генетични ресурси в наши дни. Получените резултати алармират за необходимостта от стриктно спазване на предприетите мерки за защита и още по-задълбочено изследване на генетичния и метаболитен профил на *Centranthus kelleri*.

Ключови дими: *Centranthus kelleri*, ендемит, генетични ресурси, вторични метаболити, опазване

Genetic diversity, sustainable use and conservation of the critically endangered bulgarian endemic *Centranthus kelleri* (Stoj., Stef. & T. Georgiev) Stoj. & Stef. (Valerianaceae)
Galya Petrova, Stefan Petrov
Medical university, Sofia

Centranthus kelleri (Stoj., Stef. & T. Georgiev) Stoj. & Stef. (Valerianaceae) is a critically endangered Bulgarian endemic species listed in the Red Book of the Republic of Bulgaria. Its two known populations are located within the boundaries of Pirin National Park and Vrachanski Balkan Nature Park and are protected under the European ecological network Natura 2000. Nevertheless, rapidly progressing global climate change represents a major threat to the survival of this unique plant species. The ongoing pollinator crisis further exacerbates the conservation challenges facing *C. kelleri*. Considering the species' rich content of key secondary metabolites and its pharmaceutical potential, we conducted molecular analyses to investigate its taxonomic and micromorphological characteristics and to assess the current state of available genetic resources. The results obtained highlight the urgent need for strict adherence to existing conservation measures and for further in-depth studies of the genetic and metabolic profile of *Centranthus kelleri*.

Key words: *Centranthus kelleri*, endemic, genetic resources, secondary metabolites, conservation

Стопанско и медицинско значение на продуктите получени от едногърба камила (*Camelus dromedaries. L.*)

Теодора Йосифова¹, Сейф Ал-Хаджадж¹, Михаил Червенков^{1,2}

¹ Лесотехнически университет

*² Институт по биоразнообразие и
екосистемни изследвания – БАН*

Настоящият обзор разглежда състава и потенциалното приложение на продукти, получени от едногърби камили, с акцент върху месото, млякото и някои вторични продукти от трупа. Целта е да се анализират техните хранителни и биологични свойства, както и възможностите за приложението им в хранителната индустрия, медицината и козметиката.

Камилското месо се характеризира с разнообразен хранителен състав, включващ по-ниско съдържание на мазнини и холестерол и по-здравословно съотношение между ненаситени и наситени мастни киселини в сравнение с други видове месо. То е добър източник на протеин, желязо, цинк и витамини от група В, както и на биологично активни съединения. Камилското мляко е богато на функционални протеини, включително лактоферин, лизозим и имуноглобулини, които проявяват антибактериални, антивирусни и потенциални терапевтични свойства. Съдържанието на бета-лактоферин е по-ниско спрямо кравето мляко, което намалява алергичните реакции към камилското мляко. Поради наличието на алфа-хидроксил киселини камилското мляко също може да бъде използвано в козметичната индустрия.

Лойта, колагенът и желатинът извлечени от камилски тъкани, намират приложение в хранителната и текстилна индустрия, медицината и козметиката. Проучените данни подчертават значителния потенциал на камилските продукти, като устойчив алтернативен ресурс с нарастващо значение за развитието на функционални храни, иновативни методи на лечение и суровини за козметичната индустрия.

Ключови думи: *камила, месо, мляко, козметика, храни*

Economic and medical significance of products obtained from the dromedary camel (*Camelus dromedaries. L.*)

Teodora Yosifova¹, Seif Al-Hajjaj¹, Mihail Chervenkov^{1,2}

¹ University of Forestry

² Institute of Biodiversity and Ecosystem Research – BAS

This review examines the composition and potential applications of products derived from dromedary camels, with a focus on meat, milk, and certain by-products from the carcass. The aim is to analyze their nutritional and biological properties, as well as their potential applications in the food industry, medicine, and cosmetics.

Camel meat is characterized by a diverse nutritional composition, including lower fat and cholesterol content and a healthier ratio of unsaturated to saturated fatty acids compared to other types of meat. It is a good source of protein, iron, zinc, B vitamins, and biologically active compounds. Camel milk is rich in functional proteins, including lactoferrin, lysozyme, and immunoglobulins, which exhibit antibacterial, antiviral, and potential therapeutic properties. The beta-lactoferrin content is lower than in cow's milk, which reduces allergic reactions to camel milk. Due to the presence of alpha-hydroxyl acids, camel milk can also be used in the cosmetics industry.

Camel hump fat, collagen, and gelatin extracted from camel tissues are used in the food and textile industries, medicine, and cosmetics. The data highlights the significant potential of camel products as a sustainable alternative source with growing importance for the development of functional foods, innovative treatment methods, and raw materials for the cosmetics industry.

Key words: *camel, meat, milk, cosmetics, food*

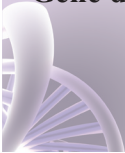
Генетичен допинг – как мутация в миостатиновия ген може да увеличи мускулната маса при кучета от породата Уипет

Надежда Луканова

Център за оценка на риска по хранителната верига

Двойното замускуляване е признак, описан по-рано при различни видове бозайници, включително говеда, овце, свине и др., който се причинява от мутации в гена на миостатина (MSTN). При кучета, конкретно от породата Уипет (известна още като малка Английска хрътка) е наблюдавана нова мутация в MSTN, която води до двойно замускулен фенотип, известен сред развъдчиците като „победител“. Кучетата с този фенотип притежават два алела от мутацията на MSTN, което води до преждевременно спиране на кодона при аминокиселина 313. Кучетата, които имат само един алел на мутацията (хетерозиготни), фенотипно са по-мускулести и значително по-бързи в провежданите състезания за кучета, за разлика от кучетата, които са от „дивия тип“ – т.е. не се наблюдава мутация. Кучетата, хомозиготни по мутирания тип, т.е. притежават два алела на мутацията, фенотипно са много замускулени от „диви и хетерозиготния тип“. Въз основа само на фенотипни характеристики на кучетата развъдчиците могат да използват ползата от полиморфизми в генотипа, повишаващи производителността при животните. Хетерозиготите индивиди имат полиморфизъм, повишаващ производителността, който осигурява конкурентно предимство при състезания с кучета.

Ключови думи: *миостатин (MSTN), мутация, кучета*



Gene doping – how a mutation in the myostatin gene can increase muscle mass in Whippet dogs

Nadejda Lukanova

Risk Assessment Center on Food Chain

Double muscling has been documented in various mammalian species, including cattle, sheep, and pigs. This trait is attributed to mutations in the myostatin (MSTN) gene. It is caused by mutations in the myostatin (MSTN) gene. In dogs, especially whippets (also called miniature English greyhounds), a new change in a gene called MSTN has been observed, resulting in a double muscling phenotype that is recognized among breeders as „winner.“ Dogs with this phenotype have two alleles of the MSTN mutation, which results in a premature stop codon at amino acid 313. Dogs that have only one allele of the mutation (heterozygous) are phenotypically more muscular and significantly faster in dog competitions than dogs that are „wild type“ - i.e., do not have the mutation. Dogs homozygous for the mutated type, i.e. possessing two alleles of the mutation, are phenotypically more muscular than the „wild and heterozygous type“. Based on the phenotypic characteristics of the dogs alone, breeders can take advantage of performance-enhancing polymorphisms in the genotype in the animals. Heterozygous individuals have a performance-enhancing polymorphism that provides a competitive advantage in dog racing.

Key words: *myostatin (MSTN), mutation, dogs*

Приоритетни устойчиви замърсители в двучерупчести мекотели: оценка на потенциалния риск за човешкото здраве

Станислава Георгиева, Диана Добрева, Албена Мерджанова

Медицински университет – Варна

Двучерупчестите мекотели имат висока способност за биоакумулиране на замърсители от морската среда и затова често се използват като биоиндикатори. Целта на изследването беше да се определят полициклични ароматни въглеводороди (PAHs) и микропластмасови частици в черна мида (*Mytilus galloprovincialis*) и да се оценят потенциалните рискове за здравето, свързани с консумацията на морски дарове. Приоритетни замърсители бяха открити в проби от диви и култивирани миди, събрани от различни места за вземане на проби по българското Черноморско крайбрежие. Концентрациите на ПАВ бяха определени в меките тъкани на мидите чрез едновременна екстракция с ускорен екстрактор с разтворител (ASE) и бяха открити чрез газова хроматография с маспектрометрия.

Резултатите показаха, че нискомолекулните PAHs са преобладаващи - над 96% от общите нива на PAHs в черните миди. Сумата от четири приоритетни PAH (4 PAHs) в *Mytilus galloprovincialis* от южната част на Черноморското крайбрежие (Созопол) беше установена по-висока, отколкото в северната зона за вземане на проби (Каварна). Сумата от 4 PAHs (средно 0,35 ng/g ww) в миди от черноморското крайбрежие на България е установена под границата, определена в Регламента на ЕС. Потенциалният неканцерогенен риск е оценен чрез приблизителния дневен прием на PAHs чрез консумация на морски дарове. Изчисляването на коефициента на опасност (HQ) показва, че консумацията на миди не представлява риск за човешкото здраве. Общото количество на микропластмасови частици в мидите е установено като $4,2 \pm 1,8$ частици на грам (pt/g). Идентифицираните микропластмаси са предимно влакна, с цветове прозрачно, червено и черно. Микропластмасовите частици са с много малки размери (20-100 μm), което представлява сериозна опасност за морските организми и потенциален риск за хората.

Ключови думи: здравен риск, полициклични ароматни въглеводороди, микропластмаса, миди, Черно море

Priority persistent pollutants in bivalve mollusks: assessment of the potential human health risk

Stanislava Georgieva, Diana Dobрева and Albena Merdzhanova
Medical University – Varna, Bulgaria

Bivalve mollusks have high capability to bioaccumulate pollutants from marine environment and therefore they are often used as bioindicators. The aim of the study was to determine polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and microplastics in black mussel (*Mytilus galloprovincialis*) and to evaluate the potential health risks associated with seafood consumption. Priority pollutants were found in wild and cultivated mussels samples collected from different sampling sites of the Bulgarian Black Sea coast. The concentrations of PAHs were determined in mussel soft tissues by simultaneous extraction by accelerated solvent extractor (ASE) and were detected by gas chromatography system with mass spectrometry.

The results showed the low molecular weight PAHs were predominant - over 96% of total PAH levels in black mussels. The sum of four priority PAH (4PAHs) in *Mytilus galloprovincialis* from south part of Black Sea coast (Sozopol) was found higher than Northern sampling area (Kavarna). The sum of 4 PAHs (mean 0.35 ng/g ww) in mussels from Black Sea coast of Bulgaria was found below the limit set in EC Regulation. The potential non-carcinogenic risk was assessed by estimated Daily Intake of PAHs through seafood consumption. Calculation of hazard quotient (HQ) showed that shellfish consumption did not pose a risk to human health. The total abundance of microplastic in mussels was found 4.2 ± 1.8 particle per gram (pt/g). The microplastics identified were primarily fibers, with colors including transparent, red and black. The microplastic particles were found very small in size (20-100 μm), which is a serious danger to marine organisms and a potential risk to humans.

Keywords: *health risk, polycyclic aromatic hydrocarbons, microplastic, mussels, Black Sea*

ПОСТЕРИ

Качество на семенните еякулати при дребни преживни като индиректен фактор за качество на храните

Красимир Коцев, Десислава Абаджиева

*Институт по биология и имунология на размножаването „Акад.
Кирил Братанов“ - Българска Академия на Науката*

Качеството на семенните еякулати при дребните преживни животни представлява ключов показател за репродуктивния потенциал на разплодниците и има индиректно, но съществено значение за качеството и безопасността на храните от животински произход. Настоящото изследване има за цел да оцени ефекта на градиентната сепарация чрез Percoll върху основните количествени и кинематични характеристики на сперматозоидите при кочове (*Ovis aries*) и да анализира приложимостта на технологията за целенасочено управление на половия състав на потомството. Семенният материал е анализиран чрез компютър-асистирана система за спермален анализ (CASA), като са сравнени нативни еякулати с фракции, обогатени на X- и Y-носеци сперматозоиди (RX и RY). Резултатите показват статистически значимо намаление на концентрацията, общата и прогресивната подвижност, както и на кинематичните параметри (VCL, VAP, VSL) при сексираните фракции спрямо контролната група ($P < 0.05$). Въпреки това, фракцията RY демонстрира относително по-добра съхраненост на прогресивната подвижност в сравнение с RX. Получените данни потвърждават, че градиентната сепарация чрез Percoll оказва влияние върху функционалния статус на сперматозоидите, но същевременно предоставя възможности за прилагане на репродуктивни биотехнологии с цел повишаване на рентабилността, стандартизацията и предсказуемостта на животинската продукция. Внедряването на подобни подходи при дребните преживни животни може да допринесе за устойчивото развитие на сектора и за подобряване на качеството на суровините по хранителната верига.

Ключови думи: семенни еякулати, дребни преживни, качество на храната

Semen quality in small ruminants as an indirect factor for food quality

Krasimir Kotzev, Desislava Abadjieva

Institute of Biology and Immunology of Reproduction „Acad. Kiril Bratanov“, Bulgarian Academy of Sciences

The quality of semen in small ruminants represents a key indicator of the reproductive potential of breeding males and has an indirect, yet significant, impact on the quality and safety of animal-derived food products. The present study aimed to evaluate the effect of Percoll gradient separation on the main quantitative and kinematic characteristics of spermatozoa in rams (*Ovis aries*) and to analyze the applicability of this technology for targeted management of offspring sex ratio. Semen samples were analyzed using a computer-assisted sperm analysis (CASA) system, comparing native ejaculates with fractions enriched in X- and Y-bearing spermatozoa (RX and RY). The results showed a statistically significant reduction in concentration, total and progressive motility, as well as kinematic parameters (VCL, VAP, VSL) in the sexed fractions compared to the control group ($P < 0.05$). Nevertheless, the RY fraction demonstrated relatively better preservation of progressive motility compared to RX. These findings confirm that Percoll gradient separation affects the functional status of spermatozoa while providing opportunities for the application of reproductive biotechnologies aimed at improving profitability, standardization, and predictability of animal production. The implementation of such approaches in small ruminants may contribute to sustainable sector development and enhance the quality of raw materials within the food chain.

Key words: *seminal ejaculates, small ruminants, food quality*

SEMEN QUALITY IN SMALL RUMINANTS AS AN INDIRECT FACTOR FOR FOOD QUALITY

Krasimir Kotzev*, Desislava Abadjieva

Institute of Biology and Immunology of Reproduction "Acad. Kiril Bratanov",
Bulgarian Academy of Sciences, blvd. 73 Tsarigradsko Shose Street, 1113, Sofia, Bulgaria

e-mail: krasimir.kotzev9@gmail.com

Introduction

The production of safe and high-quality animal food products depends not only on feeding and management but also on the genetic potential of livestock populations. In small ruminants, the selection of breeding males plays a critical role in the "farm-to-fork" food quality concept. Semen quality is therefore a key indicator of reproductive capacity and indirectly influences the biological value and safety of food products (Bachev & Terziev, 2017; Teixeira et al., 2020). Important semen parameters include:

- Ejaculate volume;
- Sperm concentration;
- Total motility;
- Progressive motility.

Sheep farming is an important agricultural sector in Bulgaria, yet recent statistics show a decline in the sheep population, raising concerns about the sustainability of production systems. Modern reproductive technologies are therefore needed to optimize reproduction and improve genetic progress (Ministry of Agriculture, Food and Forestry, 2025).

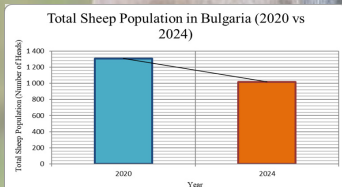


Figure 1. Number of livestock heads (sheep) for the period 2020 – 2024 according to data from the Ministry of Agriculture, Food and Forestry (2025), indicating a declining trend in the total sheep population in Bulgaria

Sperm Sexing – A Technological Approach Contributing to Meat Quality

Sperm cells carry either an X or Y chromosome, determining the sex of offspring. Technologies for sperm sexing allow the selection of sperm with a specific sex chromosome, enabling control over offspring sex ratio (Chen et al., 2025). Benefits include:

- Improved production planning;
- Increased economic efficiency;
- Better resource allocation in farms;
- Genetic improvement of livestock populations (Diers et al., 2020).

In sheep production systems, sperm sexing can support both meat-oriented production (male offspring) and dairy systems (female offspring).

Materials and Methods

The study used semen samples from clinically healthy breeding rams (*Ovis aries*) raised in farms in the Sofia region. Sperm quality was evaluated using Sperm Class Analyzer (CASA) software. Main parameters measured:

- Concentration;
- Total motility;
- Progressive motility;
- VCL – curvilinear velocity;
- VAP – average path velocity;
- VSL – straight-line velocity;

Sperm sexing was performed using modified multilayer Percoll density gradient centrifugation method was applied (Yekti et al., 2024). Samples were divided into three groups: Control (untreated semen), RX – fraction enriched with X-bearing sperm, RY – fraction enriched with Y-bearing sperm. The process employed a five-layer gradient (20% to 60% density) arranged in descending order in Pyrex tubes. Separation was achieved by centrifugation at 2200 rpm for 5 minutes at 4°C, followed by washing of the isolated fractions. The resulting RX and RY fractions were subsequently re-analyzed using CASA to assess changes in sperm kinetics.

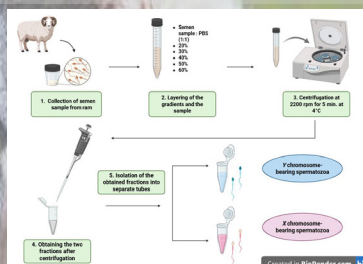


Figure 2. Experimental protocol for the separation of X- and Y-bearing spermatozoa using a multi-layer Percoll density gradient (Created in <https://BioRender.com>)

Results

Comparative analysis showed clear differences between control semen and separated fractions.

Key findings:

- Native semen had significantly higher sperm concentration;
- Total motility decreased considerably after separation;
- Progressive motility showed the strongest reduction.

The RY fraction preserved progressive motility better than RX.

Kinematic parameters (VCL, VAP, VSL) also decreased after the Percoll separation process, indicating an effect of the technological procedure on sperm function.

Table 1. Sperm parameter values in the three studied groups (mean ± SD)

Parameter	Control group (n=9)	RX group (n=9)	RY group (n=9)
Concentration (M/mL)	1582.73±182.39 ^a	314.79±33.67 ^b	219.81±74.12 ^b
Total motility (%)	97.70±1.24 ^a	50.22±9.85 ^b	47.11±11.40 ^b
Progressive motility (%)	36.09±4.68 ^a	4.71±0.50 ^c	12.54±2.47 ^b
VCL (µm/s)	62.63±4.41 ^a	28.64±2.76 ^b	32.37±6.31 ^b
VAP (µm/s)	32.13±2.47 ^a	13.71±2.25 ^b	15.28±4.14 ^b
VSL (µm/s)	17.31±1.23 ^a	9.55±3.07 ^b	13.87±5.40 ^b

Legend: Different superscript letters (a, b, c) within the same row indicate statistically significant differences (P<0.05)

The use of sexed semen enables precise control of offspring sex ratio and improves the management of livestock production systems (Holden & Butler, 2018). In meat-oriented farms, the generation of male animals enhances growth performance, feed efficiency, and carcass yield, while in dairy systems the production of female offspring supports herd renewal and increases milk production potential (Prache et al., 2022). Additionally, improved reproductive management contributes to better animal health and reduces the need for veterinary treatments, lowering the risk of antibiotic residues in animal products and supporting food safety standards (Krupová et al., 2013).

In conclusion, the present study highlights the importance of semen quality and the application of sperm separation technologies as determinants of the future development of the sheep breeding sector. Integrating modern methods for semen evaluation and sexing in small ruminants is identified as a key factor for the sector's advancement. By enabling targeted management of population sex composition, it is possible to achieve not only economic efficiency but also predictable raw material quality, which is fundamental for ensuring safety throughout the entire food chain.

Acknowledgements

This research was funded by the National Programme "Education with science" (Agreement of the Ministry of Education and Science of Bulgaria with the Bulgarian Academy of Sciences D01-172 / 18.09.2024).

Биохимичен капацитет и *in silico* анализ на липидната матрица в кокошия жълтък

Георги Петров, Десислава Абаджиева

Институт по биология и имунология на размножаването „Акад. Кирил Братанов“ - Българска Академия на Науката

Настоящото изследване представя първоначален системен анализ на липидната матрица на жълтъка от здраво, неоплодено кокоше яйце ($n = 60$), разглеждана като функционална биохимична и структурна основа за последващата ембриогенеза. Целта е да се определи изходното състояние на липидната архитектура и нейният биохимичен капацитет, преди трансформацията, настъпваща при оплождане и активиране на ембрионалното развитие. Биохимичният профил на жълтъка е характеризиран чрез анализ на основните липидни фракции, като получените резултати са съпоставени с референтни стандарти. В изследването бяха интегрирани експерименталните липидни параметри в *in silico* аналитична рамка, предназначена да трансформира биохимични измервания в сравнителни показатели за структурна организация. Индекса на структурна обезпеченост (Iss) отразява добре балансирана липидна матрица с умерена биологична вариабилност, предоставяйки интерпретативен дескриптор на готовността на жълтъка за бъдещо развитие. Предложеният модел функционира като аналитичен инструмент, който улеснява интерпретацията на емпиричните липидни данни. Този комбиниран експериментален и изчислителен подход установява референтна рамка за бъдещи изследвания, насочени към трансформациите на липидната матрица по време на оплождането и ранна ембриогенеза, както и за сравнителни оценки на качеството на яйцата в контекста на храненето и безопасността на храните.

Ключови думи: *жълтък, кокоше яйце, липиди, ембриогенеза*



Biochemical Capacity and In Silico Analysis of the Lipid Matrix in Hen Egg Yolk

Georgi Petrov, Desislava Abadjieva

*Institute of Biology and Immunology of Reproduction „Acad. Kiril
Bratanov“, Bulgarian Academy of Sciences*

The present study presents an initial systematic analysis of the lipid matrix of the yolk from healthy, unfertilized hen eggs ($n = 60$), considered as a functional biochemical and structural foundation for subsequent embryogenesis. The aim is to define the baseline state of the lipid architecture and its biochemical capacity prior to the transformation that occurs upon fertilization and activation of embryonic development. The biochemical profile of the yolk was characterized through analysis of the major lipid fractions, and the obtained results were compared with reference standards. Experimental lipid parameters were integrated into an in silico analytical framework designed to transform biochemical measurements into comparative indicators of structural organization. Index of Structural Sufficiency (Iss) reflects a well-balanced lipid matrix with moderate biological variability, providing an interpretative descriptor of the yolk's readiness for future development. The proposed model functions as an analytical tool that facilitates the interpretation of empirical lipid data. This combined experimental and computational approach establishes a reference framework for future studies focused on transformations of the lipid matrix during fertilization and early embryogenesis, as well as for comparative assessments of egg quality in the context of nutrition and food safety.

Key words: *yolk, hen's egg, lipids, embryogenesis*

BIOCHEMICAL CAPACITY AND *IN SILICO* ANALYSIS OF THE LIPID MATRIX IN HEN EGG YOLK

Georgi Petrov*, Desislava Abadjieva

*Institute of Biology and Immunology of Reproduction "Acad. Kiril Bratanov",
Bulgarian Academy of Sciences, blvd. 73 Tsarigradsko Shose Street, 1113, Sofia, Bulgaria*

e-mail: georgipetrov5566@gmail.com

Introduction

The chicken (*Gallus gallus domesticus*) egg is a unique biological system, combining the properties of a high-quality food product and an autonomous reproductive unit (Vaillant & Vuma, 2015; Sah & Mishra, 2018; Scanes et al., 2020).

The yolk is the primary source of energy, structural lipids, and bioactive compounds (Vieira, 2007). For humans, it provides phospholipids, choline, polyunsaturated fatty acids, and fat-soluble vitamins (Patil et al., 2022), while for the developing embryo, it is the main nutritional reserve with albumin (Hatta et al., 2007).

During embryogenesis, yolk contents are degraded by enzymes into absorbable molecules (Gilbert & Barresi, 2018). Extraembryonic tissues – yolk sac, amnion, allantois – also utilize yolk resources (Ramos et al., 2022; Zhao et al., 2024).

Limited studies link the yolk lipid profile to egg quality and embryonic support (Duan et al., 2013), especially in unfertilized, healthy eggs.

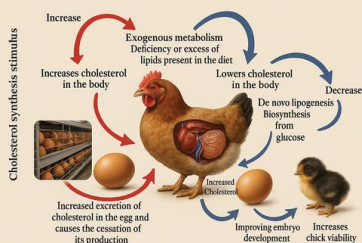


Fig.1. Conceptual model of dietary lipid metabolism in laying hens and its influence on egg cholesterol and embryo viability (Noble & Cocchi, 1990).

Materials and Methods

The study was conducted on 60 chicken eggs obtained from a commercial hatchery. Eggs were produced by laying hens of the Line Brown breed, raised under standard conditions. Samples with similar weight and without visible defects were selected. All eggs were unfertilized and served as a baseline biological system for evaluating the yolk lipid matrix prior to embryonic development.

Lipids were extracted from egg yolks and analyzed for total lipids, cholesterol, phospholipids, and neutral lipids (triglycerides). Total lipid content was determined using chloroform-methanol extraction (2:1 v/v) according to Ahn et al. (2006). Cholesterol and phospholipids were quantified following the methods of Hwang et al. (2003) and Zhou et al. (2010), respectively. Absorbance was measured at 206 nm using a UV-1800 spectrophotometer.

An *in silico* model implemented in Python (v. 3.9) was used to simulate lipid flux and calculate a Structural Support Index (SSI) based on lipid parameters and a metabolic utilization coefficient ($\sigma = 0.85$) (Noble & Cocchi, 1990).

Results

The lipid composition of chicken egg yolks was analyzed to evaluate their quality as a functional nutritional matrix and baseline for potential embryonic development. Measured parameters included total lipids, phospholipids, cholesterol, and triglycerides. The experimentally determined values for total lipids and phospholipids were in good agreement with international reference databases (USDA, FAO, EFSA), often at the upper range of reported values, confirming the physiological completeness of the material. Cholesterol showed moderate individual variability, while triglycerides dominated as the primary energy reserve. These parameters indicate the structural stability of the yolk lipid matrix, essential for membrane organization and energy supply during early embryogenesis. Structural Support Index (SSI), integrating ratios between major lipid fractions, was calculated as 1.42 ± 0.27 , reflecting the structural and metabolic readiness of the yolk lipid matrix (Table. 1).

Table.1 Lipid composition of egg yolk: Empirical data and international reference values.

Notes: 1.Reference values are taken from established international databases; ranges are indicated where available; 2."-" indicates that the database does not provide a specific value for the parameter.

Parameter	Empirical data	USDA FoodData Central (fdc.nal.usda.gov)	FAO/INFOODS (fao.org)	EFSA Food Composition (efsa.europa.eu)
Total lipid (g /100 g yolk)	32.50 ± 1.78	26.5	31.9	32–33
Phospholipids (% of total lipid)	7.80 ± 0.74	–	7.5	7.0–8.0
Cholesterol (g /100 g yolk)	1.591 ± 0.22	1.085	1.850	1.5–2.0
Triglycerides (% of total lipid)	65.10 ± 2.00	–	65	64–66

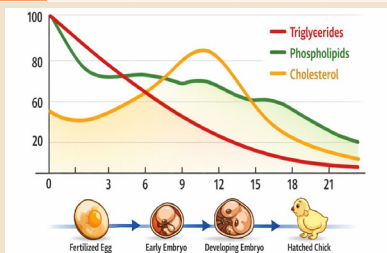


Fig.2. Functional resource for embryonic growth and membrane formation. The ratio of triglycerides, phospholipids, and cholesterol reflects the complex organization of the yolk lipid system, in which energy and structural components are balanced in a way that allows both stability and functional flexibility.

In conclusion, the chicken egg yolk represents a functionally integrated biological system with a dual role: as a primary nutritional matrix for human consumption and as a potential source of energy and structural substrates for embryonic development. Our results show that yolks from unfertilized eggs have a well-organized lipid profile, with balanced proportions of triglycerides, phospholipids, and cholesterol, consistent with established international reference values. The relatively high phospholipid content indicates a structurally stable lipid matrix, supporting the integrity and functional organization of the yolk. The proposed *in silico* Structural Support Index (SSI) integrates major lipid fractions and provides a framework for assessing the structural and metabolic readiness of the yolk lipid matrix. This approach offers a tool for interpreting experimental data and lays the groundwork for future studies on the effects of diet, production conditions, and biological variability on egg quality and embryonic potential.

Acknowledgement:

This research was funded by the National Programme "Education with science" (Agreement of the Ministry of education and Science of Bulgaria with the Bulgarian Academy of Sciences D01-172 / 18.09.2024)*.

Ефект на микроразмножаването върху ензимната и неензимна антиоксидантна активност на *Physalis peruviana* L.

Мария Генева

*Институт по физиология на растенията и генетика,
Българска академия на науките*

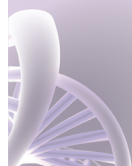
Това проучване изследва влиянието на регулаторите на растежа на растенията върху антиоксидантната активност на микроразмножен *Physalis peruviana* L., медицински вид, ценен заради богатите на хранителни вещества плодове с биологична активност. Поради стресовите условия (висока влажност, слаба светлина и ограничен газообмен) на които растенията са подложени по време на *in vitro* размножаването, натрупването на реактивни кислородни видове може да доведе до оксидативен стрес. Растенията противодействат на това чрез ензимни и неензимни антиоксидантни защитни системи, което прави важно да се разбере как условията на култивирането и регулаторите на растежа влияят на тези реакции. Експлантите бяха култивирани в MS среда, допълнена с 6-бензиламинопурин, зеатин или тидиазурон (0,5 и 1,0 mg/L), за да се оцени микроразмножаването на микропрорастъците. Вкореняването беше индуцирано върху ½ MS среда, съдържаща IBA и IAA (0,1 и 0,5 mg/L). Микропрорастъците бяха успешно аклиматизирани *ex vitro* на почвено-торфена смес, постигайки 100% степен на преживяемост. Резултатите показват, че антиоксидантните отговори са силно повлияни от концентрацията на цитокинините. По-ниските нива на цитокинин насърчават по-високо натрупване на метаболити с антиоксидантен потенциал, което предполага повишен неензимен антиоксидантен капацитет. Обратно, по-високите концентрации на цитокинин стимулират повишена активност на антиоксидантните ензими, което показва активиране на ензимните защитни механизми. Следователно, типът и концентрацията на растежния регулатор играят критична роля в модулирането на реакциите на оксидативен стрес по време на микроразмножаване. Изследването дава представа за оптимизиране на условията на *in vitro* култивирането за подобряване на качеството на растенията и антиоксидантния потенциал, подкрепяйки използването на микроразмножаване за широкомащабно производство на *Physalis peruviana* с функционална и медицинска стойност.

Ключови думи: антиоксидантна активност, *in vitro* размножаване, *Physalis peruviana* (L.), регулатори на растежа на растенията

Effect of micropropagation on *Physalis peruviana* L. enzyme and non-enzyme antioxidant activity

Maria Geneva

*Institute of Plant Physiology and Genetics,
Bulgarian Academy of Sciences*



This study examines how plant growth regulators influence the antioxidant activity of micropropagated *Physalis peruviana* L., a medicinal species valued for its nutrient-rich fruits and diverse bioactive compounds. Because in vitro propagation exposes plantlets to stressful conditions such as high humidity, low light, and limited gas exchange, the accumulation of reactive oxygen species can lead to oxidative stress. Plants counteract this through enzymatic and non-enzymatic antioxidant defence systems, making it important to understand how culture conditions and growth regulators affect these responses. Explants were cultured on MS medium supplemented with different cytokinins—6-benzylaminopurine, zeatin, and thidiazuron—at concentrations of 0.5 and 1.0 mg/L to evaluate shoot multiplication. Rooting was induced on half-strength medium containing auxins (IBA and IAA) at 0.1 and 0.5 mg/L. The regenerated plantlets were successfully acclimatised ex vitro, achieving a 100% survival rate after two months, indicating the effectiveness of the propagation protocol. The results showed that antioxidant responses were strongly influenced by cytokinin concentration. Lower cytokinin levels (0.5 mg/L) promoted higher accumulation of metabolites with antioxidant potential, suggesting enhanced non-enzymatic antioxidant capacity. In contrast, higher cytokinin concentrations stimulated increased activity of antioxidant enzymes, indicating activation of enzymatic defence mechanisms. These findings demonstrate that growth regulator type and concentration play a critical role in modulating oxidative stress responses during micropropagation. Overall, the research provides insight into optimising in vitro culture conditions to improve plant quality and antioxidant potential, supporting the use of micropropagation for large-scale production of *Physalis peruviana* with functional and medicinal value.

Keywords: *antioxidant metabolites, in vitro propagation, Physalis peruviana (L.), plant growth regulators*

EFFECT OF MICROPROPAGATION ON *PHYSALIS PERUVIANA* L. ENZYME AND NON-ENZYME ANTIOXIDANT ACTIVITY

Maria Geneva*, Eli Zayova, Elisaveta Kirova, Mariana Sichanova

¹Institute of Plant Physiology and Genetics, Bulgarian Academy of Sciences, Acad. G. Bonchev Street, Bldg.

21, 1113 Sofia, Bulgaria

*Corresponding author: Maria Geneva, e-mail: bavkova2@yahoo.com



Introduction This study examines how plant growth regulators influence the antioxidant activity of micropropagated *Physalis peruviana* L., a medicinal species valued for its nutrient-rich fruits and diverse bioactive compounds. Because *in vitro* propagation exposes plantlets to stressful conditions such as high humidity, low light, and limited gas exchange, the accumulation of reactive oxygen species can lead to oxidative stress. Plants counteract this through enzymatic and non-enzymatic antioxidant defence systems, making it important to understand how culture conditions and growth regulators affect these responses.



Figure 1. Micro propagation of *P. peruviana*: Shoot formation on MS medium supplemented with: a) 1.0 mg L⁻¹ BAP; b) 1.0 mg L⁻¹ Zeatin; c) 1.0 mg L⁻¹ TDZ. *In vitro* rooting of *P. peruviana* on half-strength MS medium with: d) 0 mg L⁻¹ auxins – control; e) 0.1 mg L⁻¹ IBA; f) 0.1 mg L⁻¹ IAA; g) *Ex vitro* acclimatised plants grown on soil: sand: perlite (2: 1 v/v/v) for two months.

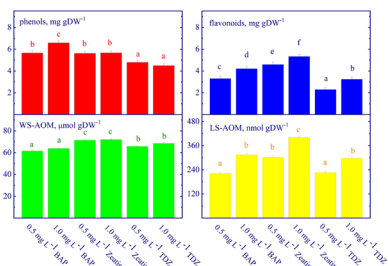


Figure 2. Content of metabolites with antioxidant properties in the *in vitro* propagated *P. peruviana*. Values are means $\pm$ SE, n=3; different letters indicate significant differences assessed by Fisher LSD test (P<0.05) after performing ANOVA multi-factor analysis.

The results showed that antioxidant responses were strongly influenced by cytokinin concentration. Lower cytokinin levels (0.5 mg/L) led to greater accumulation of metabolites with antioxidant potential, suggesting enhanced non-enzymatic antioxidant capacity. In contrast, higher cytokinin concentrations increased antioxidant enzyme activity, indicating activation of enzymatic defence mechanisms. These findings demonstrate that the type and concentration of plant growth regulators play a critical role in modulating oxidative stress responses during micropropagation. Overall, the research provides insights into optimising *in vitro* culture conditions to improve plant quality and antioxidant potential, supporting the use of micropropagation for large-scale production of *Physalis peruviana* with functional and medicinal value.



Materials and methods The explants were cultured on MS medium supplemented with 7.0 g L⁻¹ agar, 3.0% sucrose and different cytokinins - 6-benzylaminopurine (BAP), zeatin, and thidiazuron (TDZ) - at concentrations of 0.5 and 1.0 mg L⁻¹ to evaluate shoot multiplication. After five weeks of cultivation, the percentage of formed shoots was determined, as well as the height and the average number of shoots per explant. Rooting was induced on half-strength MS medium supplemented with 7.0 g L⁻¹ agar, 2.0% sucrose (control variant), and auxins (IBA and IAA) at 0.1 and 0.5 mg L⁻¹. The regenerated plantlets were successfully acclimatised *ex vitro*, achieving a 100% survival rate after two months, indicating the effectiveness of the propagation protocol.

Table 1. Effect of cytokinines on the micropropagation of *P. peruviana* shoots after five weeks of cultivation

PGR (mg L ⁻¹)	Micropropagation rate (%)	Average number of shoots (explant ⁻¹)	Average shoots height (cm)
0.5 BAP	75	2.9 $\pm$ 0.18 ^b	2.3 $\pm$ 0.20 ^c
1.0 BAP	90	5.3 $\pm$ 0.36 ^d	1.2 $\pm$ 0.11 ^a
0.5 Zeatin	65	1.8 $\pm$ 0.16 ^a	1.7 $\pm$ 0.15 ^c
1.0 Zeatin	70	2.3 $\pm$ 0.19 ^{ab}	1.4 $\pm$ 0.12 ^b
0.5 TDZ	80	4.0 $\pm$ 0.27 ^c	2.0 $\pm$ 0.18 ^d
1.0 TDZ	95	6.6 $\pm$ 0.41 ^e	1.5 $\pm$ 0.13 ^{bc}

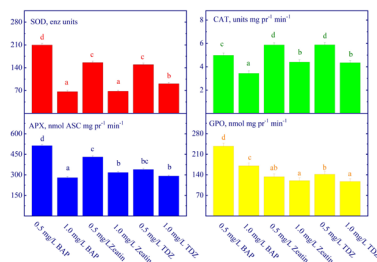


Figure 3. The activity of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), guaiacol peroxidase (GPO), and ascorbate peroxidase (APX) in the *in vitro* propagated *P. peruviana*. Values are means $\pm$ SE, n=3; different letters indicate significant differences assessed by Fisher LSD test (P<0.05) after performing ANOVA multi-factor analysis

**Влияние на креатина и креатин лизината върху *in vitro*
култивирането и антиоксидантния статус на
*Leontopodium alpinum***

Камелия Миладинова-Георгиева, Мария Генева, Мария Петрова,
Марияна Сичанова, Елисавета Кирова, Ели Зайова
Институт по физиология на растенията и генетика,
Българска академия на науките

Интересът към лечебните растения през последните три десетилетия нараства поради техните предимства спрямо синтетичните лекарства. Еделвайсът (*Leontopodium alpinum* Cass.) е широко използван в народната и официалната медицина за лечение на редица заболявания като стомашно-чревни разстройства, бронхит, ангина, повишена температура, Алцхаймер, разширени вени и други. Растението е богато на ценни от фармакологична гледна точка съединения като терпеноиди, фенолни киселини, флавоноиди, кумарини, мастни киселини и други. Среща се естествено в Пиренеите, Алпите, Карпатите и на Балканския полуостров. Видът е включен в Червената книга на България и събирането му е забранено със закон.

Високият фармакологичен потенциал на вида, както и защитения му статус, налагат неговото култивиране. Растителните *in vitro* култури са удобен метод за размножаване на защитени растителни видове, тъй като изискват минимално количество стартов материал и осигуряват голям брой растения за кратък период от време. Растежът и развитието на растенията в *in vitro* условия се повлияват в голяма степен от състава на хранителната среда.

Изследвани бяха седем варианта на хранителна среда на Murashige и Skoog, шест от които обогатени с креатин или креатин лизинат в различни концентрации (1, 5 и 10 мг/л). Креатин лизинатът повлия положително апикалния растеж на растенията, натрупването на биомаса и растежа на корена. Част от използваните среди повишиха акумулацията на метаболити с антиоксидантни свойства (феноли, флавоноиди и водоразтворими антиоксидантни метаболити), както и активността на антиоксидантния ензим супероксид дисмутаза. Активностите на другите три изследвани антиоксидантни ензима – каталаза, аскорбат пероксидаза и гваякол пероксидаза, се понижиха под влияние на креатин и креатин лизинат.

Ключови думи: еделвайс, *in vitro* култивиране, антиоксиданти

Effect of creatine and creatine lysinate on in vitro cultivation and antioxidant status of *Leontopodium alpinum*

Kamelia Miladinova-Georgieva, Maria Geneva, Maria Petrova, Mariana

Sichanova, Elisaveta Kirova, Ely Zayova

*Institute of plant physiology and genetics,
Bulgarian academy of sciences*

Interest in medicinal plants has increased over the past three decades due to their advantages over synthetic drugs. Edelweiss (*Leontopodium alpinum* Cass.) is widely used in traditional and conventional medicine for treatment of various diseases such as gastrointestinal disorders, bronchitis, angina, fever, Alzheimer's disease, varicose veins, and others. The plant is rich in pharmacologically valuable compounds such as terpenoids, phenolic acids, flavonoids, coumarins, fatty acids, and others. It occurs naturally in the Pyrenees, the Alps, the Carpathians, and the Balkan Peninsula. The species is included in the Red Book of Bulgaria, and its collection is prohibited by law.

The high pharmacological potential of the species, as well as its protected status, necessitate its cultivation. Plant in vitro cultures are a convenient method for propagation of protected plant species, as they require minimal amounts of starting material and provide large numbers of plants within a short period of time. Plant growth and development under in vitro conditions are largely influenced by the composition of the culture medium.

Seven variants of Murashige and Skoog nutrient medium were studied, six of which were supplemented with creatine or creatine lysinate at different concentrations (1, 5, and 10 mg/l). Creatine lysinate increased apical growth, biomass accumulation, and root growth. Some of the tested media increased the accumulation of metabolites with antioxidant properties (phenolics, flavonoids, and water-soluble antioxidant metabolites), as well as the activity of the antioxidant enzyme superoxide dismutase. Catalase, ascorbate peroxidase, and guaiacol peroxidase activities decreased under the influence of creatine and creatine lysinate.

Key words: *edelweiss, in vitro cultivation, antioxidants*

ВЛИЯНИЕ НА КРЕАТИНА И КРЕАТИН ЛИЗИНАТА ВЪРХУ *IN VITRO* КУЛТИВИРАНЕТО И АНТИОКСИДАНТНИЯ СТАТУС НА *LEONTOPODIUM ALPINUM* CASS./

EFFECT OF CREATINE AND CREATINE LYSINATE ON *IN VITRO* CULTIVATION AND ANTIOXIDANT STATUS OF *LEONTOPODIUM ALPINUM* CASS.

Камелия Милadinova-Георгиева*, Мария Генева, Мария Петрова, Мариана Сичанова, Елисавета Кирова, Ели Зайнова/Kamelia Miladinova-Georgieva, Maria Geneva, Maria Petrova, Mariana Sichanova, Elisaveta Kirova, Ely Zaynova

Институт по физиология на растенията и генетика-Българска академия на науките/Institute of plant physiology and genetics-Bulgarian academy of sciences

*kameca@abv.bg

Резюме/Abstract

Еделвайсът (*Leontopodium alpinum* Cass.) (сем. *Asteraceae*) се използва за лечение на редица заболявания като стомашно-чревни разстройства, бронхит, ангина, повишена температура, Алцхаймер, разширени вени и други. Растението е богато на биологично активни вещества като терпеноиди, фенолни киселини, флавоноиди, кумарини, мастни киселини и други. Видът е включен в Червената книга на Република България и събирането му е забранено със закон.

Високият фармакологичен потенциал на вида, както и защитения му статус, налагат неговото култивиране. Растителните *in vitro* култури са удобен метод за размножаване на защитени растителни видове, тъй като изискват минимално количество стартов материал и осигуряват голям брой растения за кратък период от време. Растежът и развитието на растенията *in vitro* условия се повлияват в голяма степен от състава на хранителната среда.

Изследвахме влиянието на креатин (Cr) и креатин лизинат (CrL) в различни концентрации (1, 5 и 10 mg/l) върху микроразмножаването и антиоксидантния статус на растението./

Edelweiss (*Leontopodium alpinum* Cass.) (family *Asteraceae*) is used for the treatment of various diseases such as gastrointestinal disorders, bronchitis, angina, fever, Alzheimer's disease, varicose veins, and others. The plant is rich in biologically active compounds such as terpenoids, phenolic acids, flavonoids, coumarins, fatty acids, and others. The species is included in the Red Data Book of the Republic of Bulgaria, and its collection is prohibited by law.

The high pharmacological potential of the species, as well as its protected status, necessitate its cultivation. Plant *in vitro* cultures are a convenient method for the propagation of protected plant species, as they require a minimal amount of starting material and provide a large number of plants within a short period of time. The growth and development of plants under *in vitro* conditions are strongly influenced by the composition of the culture medium.

We investigated the effect of creatine (Cr) and creatine lysinate (CrL) at different concentrations (1, 5, and 10 mg/L) on the micropropagation and antioxidant status of the plant.

Ключови думи/Keywords: еделвайс, *in vitro* култивиране, антиоксидантен капацитет/edelweiss, *in vitro* cultivation, antioxidant capacity

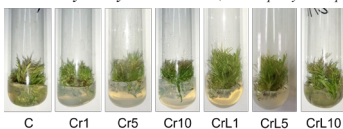


Figure 1. Multiple shoots of *Leontopodium alpinum* developed on MS media supplemented with creatine (Cr) or creatine lysinate (CrL) at 1 (Cr1/CrL1), 5 (Cr5/CrL5) and 10 (Cr10/CrL10) mg/L.

Nutrient media	Shoots			Roots		
	number	height (cm)	FW (g)	length (cm)	FW (g)	
Control	24.50±1.05c	2.44±0.21a	0.69±0.09b	1.91±0.13c	0.04±0.04b	
Cr1	23.00±1.29bc	2.31±0.21a	0.53±0.01a	1.24±0.17a	0.02±0.01a	
Cr5	20.65±1.46ab	2.35±0.20a	0.59±0.05ab	1.62±0.11b	0.03±0.03b	
Cr10	19.55±1.15ab	2.17±0.27a	0.51±0.06ab	1.64±0.04b	0.06±0.03c	
CrL1	19.05±1.22a	3.61±0.34bc	1.07±0.10d	1.94±0.17c	0.04±0.02b	
CrL5	18.20±1.28a	3.22±0.33b	0.94±0.09cd	2.62±0.17d	0.08±0.05d	
CrL10	17.05±1.32a	3.51±0.54bc	0.88±0.10c	2.77±0.31d	0.09±0.04c	

Table 1. Effect of creatine and creatine lysinate on biometric parameters of *Leontopodium alpinum* grown *in vitro*.

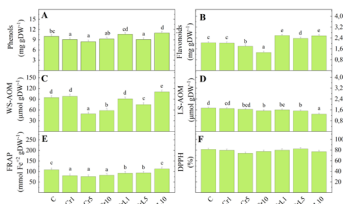


Figure 2. Antioxidant metabolic content and total antioxidant activity in *in vitro* cultivated *Leontopodium alpinum* treated with creatine (Cr) or creatine lysinate (CrL) at 1 (Cr1/CrL1), 5 (Cr5/CrL5) and 10 (Cr10/CrL10) mg/L.

Резултати/Results

Креатинът потиска растежа и понижи съдържанието на неензимни антиоксиданти и активността на антиоксидантните ензими CAT, APX и GPX. Креатин лизинатът повлия положително апикалния растеж на растенията, натрупването на биомаса и растежа на корена. Част от използваните среди повишиха акумулацията на метаболити с антиоксидантни свойства (феноли, флавоноиди и водоразтворими антиоксидантни метаболити), както и активността на антиоксидантния ензим супероксид дисмутаза. Активностите на другите три изследвани антиоксидантни ензима – каталаза, аскорбат пероксидаза и гваякол пероксидаза, се понижиха под влияние на креатин и креатин лизинат./

Creatine inhibited growth and decreased both non-enzymatic antioxidant content and the activity of CAT, APX, and GPX enzymes. Creatine lysinate increased apical growth, biomass accumulation, and root growth. Some of the tested media increased the accumulation of metabolites with antioxidant properties (phenolics, flavonoids, and water-soluble antioxidant metabolites), as well as the activity of the antioxidant enzyme superoxide dismutase. Catalase, ascorbate peroxidase, and guaiacol peroxidase activities decreased under the influence of creatine and creatine lysinate./

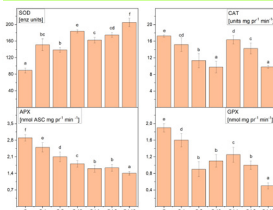
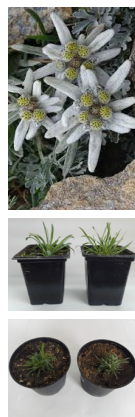


Figure 3. Activity of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), and guaiacol peroxidase (GPX) in *in vitro*-cultivated *Leontopodium alpinum* treated with creatine (Cr) or creatine lysinate (CrL) at 1 (Cr1/CrL1), 5 (Cr5/CrL5) and 10 (Cr10/CrL10) mg/L.

Заключение/Conclusion

Добавянето на креатин към хранителната среда има негативен ефект върху биометрията и натрупването на метаболити с антиоксидантна роля при еделвайс, отглеждан *in vitro*. За разлика от него, креатин лизинатът подобрява растежа и повишава антиоксидантния потенциал на растението. The addition of creatine to the culture medium has a negative effect on the biometrics and the accumulation of antioxidant metabolites in edelweiss grown *in vitro*. In contrast, creatine lysinate improves growth and enhances the antioxidant potential of the plant.



**Метаболитни промени в *in vitro* размножена *Stevia rebaudiana* в
отговор на комплекса креатин–лизинат,
добавен в ms хранителна среда**

Марияна Сичанова, Мария Генева, Камелия Миладинова-Георгиева,

Ели Зайова, Даниела Цекова

Bulgarian Academy of Sciences

Предистория: Хранителната наука ще продължава да играе ключова роля в бъдещето. Съвременната научната общност е призвана да участва в решаването на световни хранителни проблеми, като издирването на подходи, съдействащи здравето на растителните култури, осигурявайки качествена храна, в съответствие с всички екологични и социални норми. Използването на добавки, които са прекурсорни материали за съединения от групата на вторичните метаболити, повлиява различни метаболитни процеси в растенията и води до тяхната оптималната продуктивност. Тъканите култури при растенията са подходящи моделни системи за изучаване влиянието на хранителните вещества и различни добавки, които активират метаболитните дейности в клетките.

Цели: Целта на изследването е проучване влиянието на комплекса креатин-лизинат върху физиологични и биохимични параметри в *in vitro* размножена *Stevia rebaudiana*. Предполага се, че усвояването на включените аминокиселини в растенията по време на *in vitro* култивиране ще повлияе положително върху физиологията и биохимията на растенията, като по този начин ще повиши тяхната антиоксидантна активност, и ще увеличи тяхната биомаса.

Методи: Всички условия за *in vitro* размножаване бяха изпълнени. За да се определят количествено основните комплекси от биологично активни вещества в *Stevia rebaudiana*, бяха използвани редица фитохимични спектрофотометрични методи за измерване на неензимната антиоксидантна активност.

Резултати: Добавянето на креатин-лизинат към MS хранителната среда играе роля като допълнителен източник на азот и увеличи редица морфологични показатели в растението, както и активира ключови ензими и метаболити от сложния комплекс на антиоксидантната система в *Stevia rebaudiana*, повишавайки антиоксидантния ѝ капацитет. Нашите резултати предполагат, че добавката има благоприятен ефект върху физиологичните процеси при *S. rebaudiana*.

Ключови думи: *in vitro*, *Stevia rebaudiana*, креатин-лизинат, антиоксидантна активност

Metabolic changes in in vitro propagated *Stevia rebaudiana* in response to creatine-lysinate complex, added to MS medium

Mariana Sichanova, Maria Geneva, Kamelia Miladinova-Georgieva, Eli

Zayova, Daniela Tsekova

Българска Академия на Науките

Background: Nutritional science will continue to play a key role in the future. The modern scientific community is called upon to participate in solving global nutritional problems, such as finding approaches that promote the health of plant crops, providing quality food, in accordance with all environmental and social norms. The use of additives, which are precursor materials for compounds from the group of secondary metabolites, affects various metabolic processes in plants and leads to their optimal productivity. Plant tissue cultures are suitable model systems for studying the influence of nutrients and various additives that activate metabolic activities in cells.

Objectives: The aim of the study was to study the influence of the creatine-lysinate complex on physiological and biochemical parameters in in vitro propagated *Stevia rebaudiana*. It is assumed that the absorption of the included amino acids in plants during in vitro cultivation will positively affect the physiology and biochemistry of plants, thereby increasing their antioxidant activity and increasing their biomass.

Methods: All conditions for in vitro propagation, adaptation and ex vitro plant cultivation were met. In order to quantify the main complexes of biologically active substances in *Stevia rebaudiana*, a number of phytochemical spectrophotometric methods were used to measure non-enzymatic antioxidant activity.

Results: The addition of creatine-lysinate to MS medium played a role as an additional source of nitrogen and increased a number of morphological parameters in the plant, as well as activated key enzymes and metabolites of the complex antioxidant system in *Stevia rebaudiana*, increasing its antioxidant capacity. Our results suggest that the supplement has a beneficial effect on physiological processes in *S. rebaudiana*.

Key words: *in vitro*, *Stevia rebaudiana*, creatine-lysinate, antioxidant activity



Institute of Plant Physiology and Genetics,
Bulgarian Academy of Sciences

METABOLIC CHANGES IN *IN VITRO* PROPAGATED *STEVIA REBAUDIANA* IN RESPONSE TO CREATINE-LYSINATE COMPLEX, ADDED TO MS MEDIUM

Mariana Sichanova^{1*}, Maria Geneva¹, Kamelia Miladinova-Georgieva¹, Eli Zayova¹, Daniela Tsekova²

¹Institute of Plant Physiology and Genetics, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria; ²Department of Organic Chemistry, University of Chemical Technology and Metallurgy, Bulgaria
e-mail: m.sichanova@abv.bg



BACKGROUND: *Stevia rebaudiana* B. is an herbaceous perennial plant of Asteraceae family and is known as sweet leaf, honey leaf, and candy leaf. *Stevia* leaves contain many biologically active substances, which have beneficial effects on human health. The antioxidant activity of *in vitro* cultivated *S. rebaudiana* is influenced by growth regulators and amino acids added to the nutrient media.

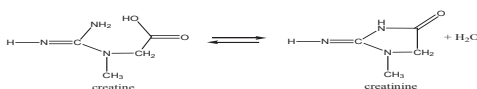
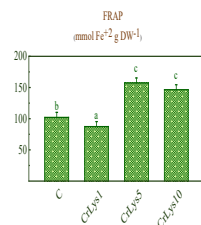


Figure 1. Creatine and creatinine in aqueous solutions exist in equilibrium depending on pH.

Creatine-lysinate is a relatively new, synergistic form of creatine, developed to improve its solubility and absorption by the plant organism.

Key structural features:

- ✓ Increased stability: The lysine component helps stabilize the creatine molecule.
- ✓ High solubility: Due to its amino acid nature, creatine-lysinate dissolves significantly better in water than the monohydrate.
- ✓ Better bioavailability: This form is designed to ensure that creatine reaches plant tissues more efficiently.



Content of metabolites with antioxidant potential (FRAP) in *Stevia rebaudiana* plants propagated *in vitro*

OBJECTIVE: This study aimed to evaluate the influence of creatine-lysinate complex at different concentrations (1, 5 and 10 mg L⁻¹) on growth characteristics and the content of secondary metabolites with antioxidant potential in *S. rebaudiana* seedlings.

MATERIALS AND METHODS: Shoot explants (1.5–2 cm) were cultured on MS medium including vitamins supplemented with 3.0% sucrose and 7.0 g L⁻¹ agar. The main biometric indicators of 30-day-old microplants were determined. A number of spectrophotometric methods for measuring non-enzymatic antioxidant activity were used to quantify the main complexes of biologically active substances in *Stevia rebaudiana* Bert.

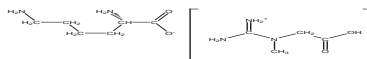
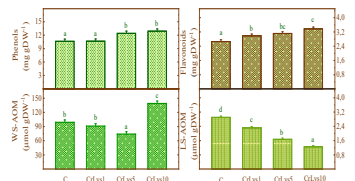


Figure 2. Molecular structure of creatine-lysinate



Content of metabolites with antioxidant capacity in *Stevia rebaudiana* plants propagated *in vitro* on MS medium and MS medium supplemented with different concentrations (1, 5, 10 mg L⁻¹) of creatine-lysinate.

Variants	Microshoots			Roots	
	Number explant ⁻¹	Height cm	FW g	Length cm	FW g
Control	1.65±0.083 ^a	8.95±0.448 ^a	0.164±0.008 ^a	1.34±0.067 ^a	0.044±0.002 ^a
C/Lys1	1.80±0.09 ^a	9.13±0.458 ^a	0.166±0.008 ^a	1.48±0.074 ^a	0.054±0.003 ^a
C/Lys5	2.40±0.12 ^a	10.04±0.502 ^a	0.185±0.009 ^a	1.76±0.088 ^a	0.064±0.003 ^a
C/Lys10	2.00±0.1 ^a	8.37±0.419 ^a	0.172±0.01 ^a	1.99±0.1 ^a	0.074±0.004 ^a
LSD	0.187	0.861	0.036	0.156	0.005

CONCLUSION: In this study, the application of creatine-lysinate complex in MS medium provoke the metabolism of *S. rebaudiana* and led to better performance in biometric parameters and to higher content of most metabolites with antioxidant potential.

Acknowledgements: This research was funded by the National Science Fund at the Bulgarian Ministry of Education and Science, Project KII-06-H56/8 12.11.21. The authors thank the Centre of Competence: BG05M2OP001-1.002-0012 "Sustainable utilization of bio-resources and waste of medicinal and aromatic plants for innovative bioactive products" for the HPLC equipment used.

Моделиране на дилатативна кардиомиопатия с фокус върху ензимното фено- и генотипизиране

Катерина Тодорова, Ани Георгиева, Росица Милчева, Здравка Петрова, Инна Суликовска, Павел Добзин, Володимир Балатски, Виктор Наврулин, Виктория Лапрус

Институт по експериментална морфология, патология и антропология с музей, Българска академия на науките

Кардиомиопатията е заболяване на сърдечния мускул и е водеща причина за сърдечна недостатъчност или опасни аритмии, както при животните, така и при хората. Това е предимно първично прогресиращо и генетично обусловено състояние на сърдечния мускул, което води до увреждания на сърдечните тонове и намалено изпомпване на кръв към останалите части на тялото. При това състояние обикновено са необходими правилно хранене и ограничаване на дейности с висока интензивност, за да се намали рискът от внезапна сърдечна смърт, което е особено важно за хората, разплодните и спортните животни. Кардиомиопатията най-често се проявява като дилатативна кардиомиопатия (ДКМП) при кучетата и конете, и хипертрофична кардиомиопатия (ХКМП) при котките. При хората е прието, че кардиомиопатиите са група заболявания, характеризиращи се с генетична хетерогенност. Както е добре известно, контракциите на миокарда са следствие от множество гликопротеини на клетъчната повърхност, включително калциеви, калиеви и натриеви йонни канали, които разпространяват електрическите импулси и акционните потенциали. В процеса на сиалилиране – модификацията на протеините, при която се образуват гликопротеини, участват няколко ензима от семейството на сиалилтрансферазите. Има някои данни за променено сиалилиране на гликопротеини, особено при човешка ДКМП. Данните, посочени по-горе, и преобладаването на ДКМП при животни и хора, провокираха нашия интерес да оценим ролята на няколко фактора в сиалилирането на гликопротеини в патогенезата на кардиомиопатията, чрез симулирани *in vivo* и *in vitro* модели, които не са генетично предразположени, и да ги сравним с публикувани изследователски данни по теми от патофизиологията и клиничната хетерогенност на ДКМП.

Ключови думи: кардиомиопатия, гликопротеини, сиалилтрансферази, *ин vivo* и *ин vitro* модели

Modeling of dilated cardiomyopathy with a focus on enzymatic pheno- and genotyping

Katerina Todorova, Any Georgieva, Rositsa Milcheva, Zdravka Petrova, Inna Sulikovska, Paweł Dobrzyń, Volodymyr Balatskyi, Viktor Navrulin, Wiktoria Laprus

Institute of Experimental Morphology, Pathology and Anthropology with Museum, Bulgarian Academy of Sciences

The cardiomyopathy is a disease of the heart muscle and is a leading cause of heart failure or dangerous arrhythmias both, in animals and humans. This is mainly primary progressive genetically determined condition, that reflexes to damages of the heart tones and reduced pumping of blood to the rest parts of the body. In the development of the condition proper nutrition and restriction to high-intensity activities are typically necessary to reduce the risk of sudden cardiac death, mostly important to humans, breeding and sporting animals. Cardiomyopathy is commonly manifested as dilated cardiomyopathy (DCM) in dogs and horses and hypertrophic cardiomyopathy (HCM) in cats. In humans it was accepted that cardiomyopathies are a group of diseases characterized by genetic heterogeneity. As is well known the contractions of the myocardium are subsequence of multiple cell surface glycoproteins including calcium, potassium and sodium ion channels that propagate the electrical impulses and action potentials. In the process of sialylation – the modification of proteins, where glycoproteins are formed, several enzymes from the family of sialyltransferases take role. There are some data about altered glycoprotein sialylation, particularly in human DCM. The data explained above and the prevalence of DCM cardiomyopathy forms in animals and hunam, provoked our interest to assess the role of several factors in glycoprotein sialylation in the pathogenesis of cardiomyopathy via simulated in vivo and in vitro models, that are not genetically predisposed and to compare with research data published on the topics of pathophysiological and clinical heterogeneity of DCM.

Key words: *cardiomyopathy, glycoproteins, sialyltransferases, in vivo and in vitro models*

MODELING OF DILATED CARDIOMYOPATHY WITH A FOCUS ON ENZYMATIC PHENO- AND GENOTYPING

Katerina Todorova^{1*}, Any Georgieva¹, Rositsa Milecheva¹, Zdravka Petrova¹, Inna Sulikowska¹, Volodymyr Balatskyi², Viktor Navralin², Wiktoria Laprus², Paweł Dobrzyń²

1. Institute of Experimental Morphology, Pathology and Anthropology with Museum, Bulgarian Academy of Sciences, 1113 Sofia, Bulgaria
2. Nencki Institute of Experimental Biology, Polish Academy of Sciences, 02-093 Warszawa, Poland

*corresponding author: katerina.todorova@yahoo.com

The cardiomyopathy is a disease of the heart muscle and is a leading cause of heart failure or dangerous arrhythmias both, in animals and humans. This is mainly primary progressive genetically determined condition, that reflexes to damages of the heart tones and reduced pumping of blood to the rest parts of the body. In the development of the condition proper nutrition and restriction to high-intensity activities are typically necessary to reduce the risk of sudden cardiac death, mostly important to humans, breeding and sporting animals. Cardiomyopathy is commonly manifested as dilated cardiomyopathy (DCM) in dogs and horses and hypertrophic cardiomyopathy (HCM) in cats. In humans it was accepted that cardiomyopathies are a group of diseases characterized by genetic heterogeneity. As is well known the contractions of the myocardium are subsequent of multiple cell surface glycoproteins including calcium, potassium and sodium ion channels that propagate the electrical impulses and action potentials. In the process of sialylation – the modification of proteins, where glycoproteins are formed, several enzymes from the family of sialyltransferases take role. There are some data about altered glycoprotein sialylation, particularly in human DCM. The data explained above and the prevalence of DCM cardiomyopathy forms in animals and humans, prompted our interest to assess the role of several factors in glycoprotein sialylation in the pathogenesis of cardiomyopathy via simulated *in vivo* and *in vitro* models, that are not genetically predisposed and to compare with research data published on the topics of pathophysiological and clinical heterogeneity of DCM.

Key words: Dilated cardiomyopathy, experimental models, sialyltransferases

Aim: Assessment of the role of several factors in glycoprotein sialylation in the pathogenesis of cardiomyopathy via simulated *in vivo* and *in vitro* models, that are not genetically predisposed and to compare with research data published on the topics of pathophysiological and heterogeneity of DCM.

Materials and methods: *In vivo model of DCM* (Immunisation №459/10.12.2020): The role of some sialyltransferases activity was tested in a non-genetically created DCM in vivo mouse model. In mice the DCM was produced by acute exposure to adrenalin, followed by 5-Fluorouracil (5-FU) administration. Adrenalin stimulates β_1 -adrenoceptors, causing tachycardia, enhanced contractility and muscle fatigue. In appropriate doses 5-FU can induce new-onset severe cardiomyopathy with insufficient left ventricular contractility. The experimental design is based on the model of isoproterenol (isoprenaline, ISO) followed by 5-FU administration, proposed by Salameh et al. 2020. ICR female mice (3 months of age) will be obtained, individually housed with supply of water and food ad libitum, 2 groups of female mice (1 gr., n=10; 2 gr., n=5) were formed: first group received one-time 0.5mg adrenalin s.c., the second was not treated - control group. Three days after the adrenalin application, the surviving mice from 1 group were randomly assigned to saline (1A group, n=5) or 5-FU administration (1B group, 15 mg/kg/day, n=5) for 10 days. The animals sacrificed under anesthesia and the hearts were fixed in 10% buffered formalin. Salameh, K., Scialtin, M., Marini, F., Floridia, S., Chiantera, A., Panzica, G., ... & Chiantera, L. (2020). A mouse model of dilated cardiomyopathy produced by isoproterenol acute exposure followed by 5-Fluorouracil administration. *Journal of Cardiovascular Development and Disease*, 10(6), 726.

Isolation and culture of neonatal murine cardiomyocytes: Neonatal cardiomyocytes were isolated from 0.3-day-old mice using an enzymatic dissociation protocol with minor modifications. Cardiomyocytes were enriched using a two-step purification procedure consisting of differential centrifugation and pre-plating on uncoated culture dishes for 1–3 h at 37°C to allow preferential attachment of fibroblasts. Cells were counted and seeded onto 1% gelatin-coated culture plates at a density of 1.3×10^5 cells/cm². Cardiomyocytes were initially cultured in DMEM high glucose supplemented with 15% fetal bovine serum (FBS) and 100 U/mL penicillin, and 100 U/mL streptomycin. After 24 h, the medium was replaced with maintenance medium consisting of DMEM high glucose supplemented with 4% FBS and penicillin/streptomycin. Cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

Cell Viability Assay: The cytotoxicity of 5-Fluorouracil (5-FU) and adrenalin was assessed using the Neutral Red Uptake (NRU) assay. Neonatal cardiomyocytes were exposed to 5-FU in concentrations of 0.5, 5, 50 and 500 μ M and adrenalin in concentrations of 1, 10, 100 μ M for 24 h. Absorbance was then measured at 540 nm using a TECAN microplate reader (TECAN, Gröding, Austria). Cell viability was calculated using the following formula: Cell viability (%) = (Absorbance of treated cells/Absorbance of control cells) $\times$ 100.

Cytomorphology: May Grünwald-Giemsa and Fluorescent Microscopy/ Acridine orange/propidium iodide staining: Cells were cultured on 13 mm-diameter cover glasses in 24-well plates and treated with 1 μ M adrenalin and 5 μ M 5-FU for 24 h. To observe morphological changes, native preparations of control and treated cardiomyocytes were stained with May Grünwald-Giemsa (Dianpath) or fluorescent dyes acridine orange (AO 1 mg/mL) and propidium iodide (PI 1 mg/mL) in PBS and images were taken using a Leica DM 5000B microscope.

Assessment of Mitochondrial Membrane Potential ($\Delta\Psi$) by JC-1 staining: Neonatal murine cardiomyocytes were seeded in 24-well plates and treated with 1 μ M adrenalin and 5 μ M 5-FU for 24 h. After treatment, cells were incubated with JC-1 dye (5 μ g/mL) for 20 min at 37°C in the dark. Fluorescence images were taken using a fluorescence microscope (Leica DM 5000B, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). The changes in the mitochondrial membrane potential was quantified with ImageJ software by measuring the mean fluorescence intensity of red (JC-1 aggregates) and green (JC-1 monomers) channels, and the red/green (R/G) ratio was calculated. A decrease in the R/G ratio indicated mitochondrial depolarization.

Molecular biological analysis: Cardiomyocytes were plated in 25 cm² tissue culture flasks at a density of 2.5×10^4 cells/mL and incubated in growth medium for 24 hours. Next day the cells were treated with 1 μ M adrenalin and 5 μ M 5-FU. Untreated cells incubated at the same culture conditions were used as control. After 24 h incubation control and treated cell cultures were washed twice with cold phosphate buffered saline (PBS), scratched using a rubber policeman, centrifuged for 5 min at 250 $\times$ g and after supernatant removal were frozen at -80 °C and stored until use for molecular biological analysis.

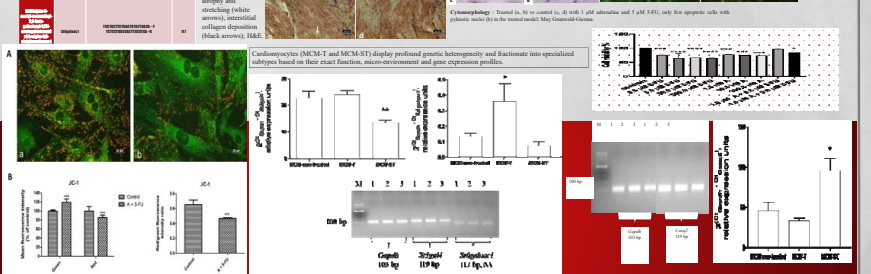
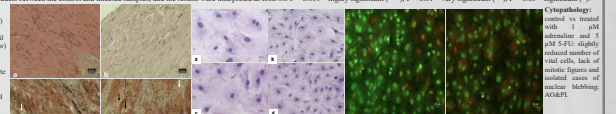
Gene expression analysis: Total RNA was extracted using RNeasy Mini Kit (Qiagen), according to the provided protocol. The yield and purity of the collected RNA were measured using S-300 spectrophotometer (Beeco). Approximately 2 μ g of total RNA from each sample were used for first strand cDNA synthesis, as previously described (Milecheva et al., 2019). The generated cDNA was quantified, and the samples were stored at -80°C. Real-time PCR was performed on 1 μ L of RT-product, containing approximately 50 ng cDNA as a template, in 20 μ L total volume of reaction using RotorGene SYBR Green PCR Kit (Qiagen) following the recommendations of the producer. Three real-time PCR reactions/sample in triplicate were performed for amplification of Gapdh, Cas2, S13344, and S13344, using RotorGene™ 6000 Real-time Analyzer (Corbett Life Science-Qiagen). The data were analyzed using Rotor Gene Q Series Software (Qiagen) and the relative quantification of the sialyltransferase expression was calculated by the $\Delta\Delta C_t$ method (Zhang et al., 2021) versus Gapdh as a reference gene. After each run, a High-Resolution Melting Curve Analysis (HRM) was performed to verify the specificity of the amplified products, which were visualized on 2.5% agarose gel supplemented with Simply Safe nucleic acid stain (EurX®) versus 100–1000 bp DNA Ladder (EurX®), and the gels were photographed with a gel documentation system Vision (Scie-Plex Ltd).

Statistical analysis: GraphPad Prism 5.03 software (San Diego, CA, USA). Non-parametric one-way analysis of variance (Kruskal-Wallis test) with Dunn's Multiple Comparison Test (significance level 0.05) was computed to detect statistically significant differences between the C_t values of the qPCR products between the control and infected samples, and the results were interpreted as follows: P < 0.001 = highly significant (**), P < 0.01 = very significant (***), P < 0.05 = significant (*).

RESULTS:

Investigated genes and their primers sequences used in this study:

Gene	Primer sequence (5' to 3')	Product size (bp)
Gapdh	Forward: 5'-TGGACGATGGGCTGGGCTGCTG-3' Reverse: 5'-AGTGGGCGTGGTGGTGGTGGT-3'	100
Cas2	Forward: 5'-TGGACGATGGGCTGGGCTGCTG-3' Reverse: 5'-AGTGGGCGTGGTGGTGGTGGT-3'	100
S13344	Forward: 5'-TGGACGATGGGCTGGGCTGCTG-3' Reverse: 5'-AGTGGGCGTGGTGGTGGTGGT-3'	100



Acknowledgments: This work was supported by the project № BG-PL/10/2020-20 27, between BAS and PBS.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into specialized subtypes based on their exact function, micro-environment and gene expression profiles.

Neonatal murine cardiomyocytes (MCM-T and MCM-ST) display profound genetic heterogeneity and facilitate into

Разпространение на вароатоза и нозематоза в различни райони на България

доц. д-р Делка Салкова, PhD, проф. д-р Калинка Гургулова, PhD
Институт по експериментална морфология, патология и антропология с музей, Българска академия на науките

Медоносната пчела (*Apis mellifera*) е вид с решаващо икономическо, селскостопанско и екологично значение. През последните десетилетия медоносните пчели са все по-изложени на различни патогени – бактерии, гъбички, вируси и паразити. Ефектът от действието на факторите все още не е напълно изяснен, но взаимодействието между различните причинители на болести по пчелите показва по-тежкото им протичане и големи загуби на пчелни колонии. Целта на тази работа е да представи резултатите от около 300 проби от пчели, изследвани за периода от пет години (2020-2024 г.) за най-често срещаните болести по пчелите – вароатоза и нозематоза, водещи до намалено производство, отслабени семейства и често висока смъртност при пчелите, както и да представи методи за ранна диагностика. В заключение можем да кажем, че анализът на представените данни показва, че медоносните пчели в България са засегнати над 80% от две значими болести: паразитни (вароатоза) и гъбични (нозематоза), както и от тяхната смесена инвазия. Ранната и точна диагностика е ключът към ефективния контрол на болестите по пчелите. Поддържането на силни и здрави семейства е предпоставка за добро производство и стабилна среда с богато биоразнообразие.

Ключови думи: *Apis mellifera*, *Varroa destructor*, *Nosema spp.*, диагноза



Spread of varroosis and nosemosis in different regions of Bulgaria

Assoc. Prof. Delka Salkov, PhD, Prof. Kalinka Gurgulova, PhD

*Institute of Experimental Morphology, Pathology and Anthropology with
Museum, Bulgarian Academy of Sciences*

The honey bee (*Apis mellifera*) is a species of crucial economic, agricultural and environmental importance. In recent decades, honey bees have been increasingly exposed to various pathogens – bacteria, fungi, viruses and parasites. The effect of the action of factors has not yet been completely understood, but the interaction between the various causative agents of bee disease indicated their more severe course and big losses of bee colonies. The aim of this work is to present the results of about 300 bee samples examined for the period of five years (2020-2024) for the most common bee diseases – varroosis and nosemosis, leading to reduced production, weakened colonies and often high mortality in bees, as well as to present methods for early diagnosis. In conclusion, we can say that the analysis of the presented data showed that honey bees in Bulgaria have been affected more than 80 % by two significant diseases: parasitic (varroosis) and fungal (nosemosis), as well as their mix invasion. Early and accurate diagnosis is the key to effective control of bee diseases. Maintaining strong and healthy colonies is a requirement for good production and a stable environment with rich biodiversity.

Key words: *Apis mellifera, Varroa destructor, Nosema spp., diagnosis*

Промени в хормоналните нива на два български сорта пшеница причинени от суша – взаимодействие с мелатонин

*Искрен Сергиев, Цветина Николова, Мартин Илиев, Зорница
Катерова, Десислава Тодорова*

Институт по физиология на растенията и генетика, БАН

Засушаването намалява добивите на селскостопанските култури поради отрицателното му въздействие върху физиологичните процеси на растенията, което се проявява на множество нива, включително промени в хормоналния баланс. Мелатонинът е повсеместно разпространен в растенията, притежава множество регулаторни функции и благоприятства физиологичното състояние на растенията особено при стресови условия. Засушаване в продължение на 5 дни е приложено върху млади растения зимна пшеница (*Triticum aestivum* L.) от българските сортове Фермер и Гинес. След периода на засушаване нормалното водоснабдяване беше възстановено. Двадесет и четири часа преди и след засушаването, растенията бяха третираны със 75 μM разтвор на мелатонин. Нивата на фитохормоните индол-3-ил оцетна киселина (IAA) и абсцисинова киселина (ABA) бяха измерени в листата на пшеницата веднага след засушаване (5D), на втория (2D-R) и четвъртия ден (4D-R) от периода на възстановяване. Засушаването предизвика значително повишаване на нивото на ABA и IAA, което беше по-силно изразено при сорт Фермер. Сорт Гинес, който е по-устойчив на засушаване, обаче реагира различно по отношение на IAA. Приложението на мелатонин модулира предизвиканите от засушаването хормонални промени, като намали отрицателното въздействие на водния дефицит и до известна степен подпомогна възстановяването на пшеницата от водния дефицит.

Ключови думи: *Triticum aestivum* (L.), засушаване, прайминг, мелатонин, фитохормон

Alterations in the hormonal levels of two Bulgarian wheat cultivars caused by drought – interaction with melatonin

Iskren Sergiev, Tsvetina Nikolova, Martin Iliev, Zornitsa Katerova,

Dessislava Todorova

Institute of Plant Physiology and Genetics, Bulgarian Academy of Sciences

Drought stress affects crop production due to its negative impact on plant physiology, which is manifested at multiple levels, including alterations of the hormonal balance. Melatonin is a biosubstance ubiquitous in plants that possesses multiple regulatory functions and benefits plant physiological state especially under stressful conditions. A five-day drought stress was applied to young winter wheat (*Triticum aestivum* L.) plants of the Bulgarian cultivars Fermer and Gines. After the drought period, the normal water supply was restored. Twenty-four hours before and after drought, plants were root supplemented with 75 μ M melatonin solution. The levels of phytohormones indol-3-yl acetic acid (IAA) and abscisic acid (ABA) was measured in wheat leaves immediately after drought (5D), on the second (2D-R) and fourth day (4D-R) of the recovery period. Drought provoked a substantial increase in the level of ABA and IAA which was better pronounced in the cv. Fermer. However, cv. Gines which is more drought tolerant reacted differently in relation to IAA. Melatonin application affected the drought-provoked hormonal alterations by lessening the negative impact of water deficit and assisted to some extent the recovery of the wheat cultivars from water shortage.

Key words: *Triticum aestivum* (L.), drought, priming, melatonin, phytohormones

ALTERATIONS IN THE HORMONAL LEVELS OF TWO BULGARIAN WHEAT CULTIVARS CAUSED BY DROUGHT – INTERACTION WITH MELATONIN

Iskren Sergiev, Tsvetina Nikolova, Martin Iliev, Zornitsa Katerova, Dessislava Todorova

Institute of Plant Physiology and Genetics - Bulgarian Academy of Sciences,
Acad. Georgi Bonchev Street, Bldg. 21, 1113 Sofia, Bulgaria

Introduction

Drought stress affects crop production due to its negative impact on plant physiology, which is manifested at multiple levels, including alterations in the hormonal balance. Indole acetic acid (IAA) and abscisic acid (ABA) are key phytohormones which regulate plant growth and reactions to stress. Melatonin is a bioactive substance, which appears to be ubiquitous in plants and possesses multiple regulatory functions. Exogenous melatonin was found to benefit plant physiological state, especially under stress conditions.

Melatonin and auxins share a common precursor from the shikimate pathway and melatonin possesses auxin-like properties. On the other hand, melatonin acts in an opposite way to abscisic acid, especially under drought stress conditions by counteracting the ABA-induced closure of stomata.

The aim of the current study is to investigate the alterations in the content of IAA and ABA in wheat plants subjected to drought and treated with melatonin. It was of special interest to investigate if there are discernible differences in the hormonal levels between susceptible or tolerant to drought wheat varieties.

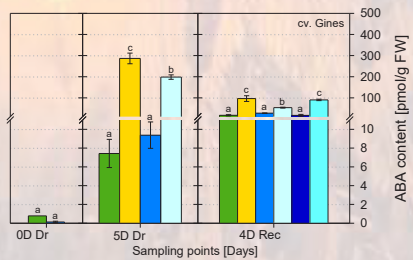
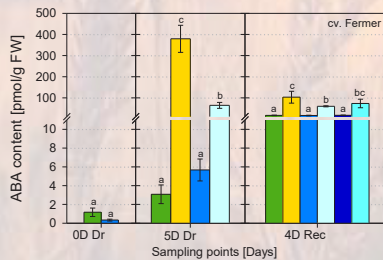
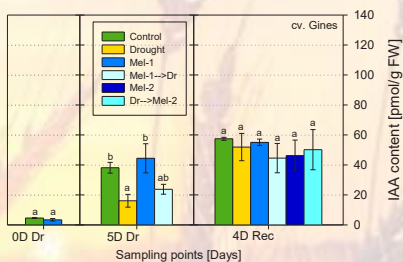
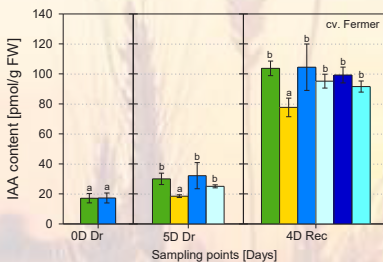
Materials and Methods

A five-day drought stress was applied to young winter wheat (*Triticum aestivum* L.) plants of the Bulgarian cultivars Fermer and Gines which are previously characterized to possess different tolerance to drought. After the drought period, the normal water supply was restored. Twenty-four hours before and after drought, plants were root supplemented with 75 μ M melatonin solution.

The levels of phytohormones indol-3-yl acetic acid and abscisic acid were measured in wheat leaves immediately after drought (5D), and on the fourth day (4D-R) of recovery.

The content of IAA and ABA was measured at 405 nm with a UV-Vis spectrophotometer (Thermo Fisher Inc., Waltham, MA, USA) with SkanIt Software 2.2 (Thermo Fisher Inc.) using respective ELISA immunoassay kit (OChemim Ltd., Olomouc, Czech Republic) according to the manufacturer's protocol.

The data presented are mean values $\pm$ Standard Error. The data were statistically evaluated by One-Way ANOVA with Duncan's post-hoc test and significant differences between treatments are indicated by different letters.



Results

- Generally, the constitutive level of IAA was lower in the drought tolerant variety "Gines" than in "Fermer". No differences between varieties were found in relation to ABA.
- Drought stress decreased the content of IAA in both varieties. During the recovery period IAA level tended to increase. In the susceptible variety "Fermer" IAA remained below the control, while in the tolerant cultivar "Gines" it neared the control.
- ABA was highly increased after 5 days of drought. This effect was better expressed in the susceptible cultivar "Fermer". After restoring the normal irrigation regime ABA levels were decreased but remained slightly higher than the controls in both cultivars.
- Melatonin by itself did not cause statistically significant alterations, but substantially adjusted the drought-induced deviations in both hormones.

**Размножаване на *Arnica montana* L. при използване на агар-
втвърдена хранителна среда и биореактор с временно потапяне**
Мирена Чакърова, Мария Петрова, Камелия Миладинова- Георгиева,
Марияна Сичанова, Мария Генева
Институт по физиология на растенията и генетика, БАН

Arnica montana L. е европейски ендемичен вид, използван от векове за лечение на различни заболявания поради своите противовъзпалителни свойства. Растението съдържа ценни вторични метаболити като сескитерпенови лактони, феноли, етерични масла и др. In vitro размножаване чрез индуциране на аксиларни прорастъци от стъблени сегменти е постигнато на хранителна среда по Murashige и Skoog, допълнена с 1 mg/l 6-бензиламинопурин и 0.1 mg/l индол-3-оцетна киселина. Установено е, че системата на култивиране влияе върху броя на индуцираните аксиларни прорастъци от експлант, височината на прорастъците, натрупаната свежа биомаса, както и върху общото съдържание на феноли и флавоноиди. Множество растения са постигнати с помощта на течна среда в биореактор RITA® (средно 11.3 ± 0.5 прорастъци от експлант) със средна височина 2.74 ± 0.15 cm. Акумулираната свежа биомаса в RITA® е 2.8 пъти по-голяма от тази, отчетена в агарова култура. Средният брой нови прорастъци от експлант, индуцирани върху агар-втвърдена среда е 4.6 ± 0.33 , със средна височина 1.81 ± 0.07 cm. По-високи нива на феноли и флавоноиди са наблюдавани при растения, отглеждани в RITA® биореактор с течна среда, в сравнение с количеството им отчетено в растения, отглеждани върху втвърдена с агар среда. Разработеният метод в биореактор с временно потапяне значително подобри мултиплицирането и синтеза на ценни метаболити в *A. montana* и може да осигури жизнени растения без болести, което би спомогнало за опазването на вида.

Ключови думи: микроразмножаване, агар-втвърдена среда, течна среда, вторични метаболити

Multiplication of *Arnica montana* L. using agar-solidified nutrient medium and temporary immersion bioreactors

Mirena Chakarova, Maria Petrova, Kamelia Miladinova- Georgieva,

Mariana Sichnaova, Maria Geneva

Institute of Plant Physiology and Genetics,

Bulgarian Academy of Sciences



Arnica montana L. is a European endemic species used for centuries to treat various diseases due to its anti-inflammatory properties. The plant contains valuable secondary metabolites such as sesquiterpene lactones, phenols, essential oils, etc. In vitro propagation by induced axillary shoots from stem segments was attained using Murashige and Skoog medium supplemented with 1 mg/l 6-Benzylaminopurine and 0.1 mg/l indole-3-acetic acid. The cultivation system was found to affect the number of induced axillary shoots from an explant, shoot height, accumulated fresh biomass, as well as total phenolic and flavonoid content. Multiple shoots were achieved using liquid medium in a RITA® bioreactor (an average of 11.3 ± 0.5 shoots per explant) with a mean shoot height of 2.74 ± 0.15 cm. The accumulated fresh biomass of RITA® was 2.8-fold more than that recorded in the agar culture. The average number of new shoots per explant induced on an agar-solidified medium was 4.6 ± 0.33 , with an average height of 1.81 ± 0.07 cm. Higher levels of phenolics and flavonoids were observed in plantlets grown in a RITA® bioreactor with liquid medium compared to the amount detected in plantlets grown on agar-solidified medium. The developed method in a temporary immersion bioreactor significantly improved the multiplication and synthesis of valuable metabolites in *A. montana* and may provide vigorous, disease-free plants, which would aid in the conservation of the species.

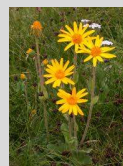
Key words: *micropropagation, agar-solidified medium, liquid medium, secondary metabolites*

MULTIPLICATION OF ARNICA MONTANA L. USING AGAR-SOLIDIFIED NUTRIENT MEDIUM AND TEMPORARY IMMERSION BIOREACTORS

Mirena Chakarova, Maria Petrova, Kamelia Miladinova-Georgieva, Mariana Sichanova, Maria Geneva

Institute of Plant Physiology and Genetics, Bulgarian Academy of Sciences, Acad. G. Bonchev Street, Bldg. 21, 1113 Sofia, Bulgaria

Arnica montana L. is a European endemic species used for centuries to treat various diseases due to its anti-inflammatory properties. The plant contains valuable secondary metabolites such as sesquiterpene lactones, phenols, essential oils, etc. *A. montana* is listed in the European Red List of Vascular Plants as Least Concern (LC). However, it faces threats in many European countries due to habitat loss and overharvesting from natural populations. The plant deficiency stresses the need for the development of effective propagation methods. Theoretically, optimizing *in vitro* culture conditions and techniques can produce millions of elite clones from the mother plant within a year. Micropropagation using an agar-solidified medium produces numerous true-to-type plants that are free of pathogens and microbial contaminants. A temporary immersion system is an advanced liquid-culture micropropagation method where plant tissues are periodically immersed in liquid nutrient medium. It provides maximum gas exchange, increased nutrient uptake, reduced hyperhydration of plant tissues, ensuring better *in vitro* plant growth and secondary metabolite yield.



Materials and methods

Arnica montana seeds (Poland origin) were used to initiate *in vitro* culture. Shoots (1.0 cm) were isolated from three-month old *in vitro* micropropagated *A. montana* plants and used as explants for experiments. Murashige and Skoog (MS) nutrient medium supplemented with 1 mg/L 6-benzylaminopurine and 0.1 mg/L indole-3-acetic acid was utilized. The experiments were conducted using both liquid and agar-solidified medium (0.6% agar). In the first case glass tubes (150 x 25 mm) with 6 ml of medium were used, with one explant per tube. Explants were vertically cultivated, slightly inserted into the agar-solidified medium. In the temporary immersion system, each vessel contained 10 shoots and 200 ml of liquid medium. The vessels were connected to an air supply operating at 0.25 vvm, with a schedule of 6-minute immersions occurring four times a day. Cultures were kept in a growth chamber at 25 ± 2 °C under a 16-hour photoperiod, provided by cool-white light at an intensity of $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Total phenolic content was determined using the method of Pleffer et al. (1998). The method of Zhishen et al. (1999) was used to determine the total flavonoid content.

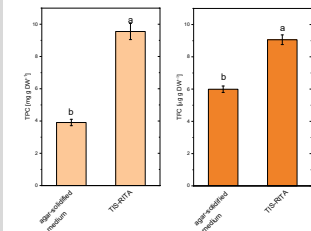
Results

Table 1. Morphometric parameters of *in vitro* propagated *Arnica montana* grown on agar medium and immersion culture type RITA®

Culture system	Shoots/explant	Plant height, cm	Fresh weight, g
Agar-solidified Culture	4.6 ± 0.33^b	1.81 ± 0.07^b	0.45 ± 0.03^b
Temporary immersion system RITA®	11.3 ± 0.5^a	2.74 ± 0.15^a	1.27 ± 0.07^a
LSD	1.22	0.34	0.16



Micropropagation using agar medium A. Multiple *in vitro* plants cultured on agar solidified medium in glass tubes. B. Close-up of micropropagated plant. C. Measurement of plant height



The content of metabolites with antioxidant power (total phenols, total flavonoids) in *Arnica montana* plantlets grown on agar solidified medium and in liquid medium using TIS RITA®



Micropropagation using an automated temporary immersion system (type RITA®) A. General view of the system. B. Micropropagated plants in the culture vessels after 4 weeks of cultivation. C. Measurement of micropropagated plants. D. Shoots divided from shoot clumps

Higher levels of phenolics and flavonoids were observed in plantlets grown in a RITA® bioreactor with liquid medium compared to the amount detected in plantlets grown on agar-solidified medium. The developed method in a temporary immersion bioreactor significantly improved the multiplication and synthesis of valuable metabolites in *A. montana* and may provide vigorous, disease-free plants, which would aid in the conservation of the species.

Acknowledgements: This research was funded by National Science Fund—Bulgaria, grant number KP1-06-H76/5 (05.12.2023)

Кинетично моделиране и сравнителна оценка на производството на млечна киселина от агроиндустриални отпадъци: влияние върху безопасността на храните, здравето на животните и растенията

Г. Найденова, Л. Добрева, С. Данова, П. Попова-Крумова, Д. Янков
Институт по инженерна химия, БАН

Устойчивото оползотворяване на агроиндустриалните отпадъци в биопродукти с висока стойност предлага значителни възможности за укрепване на кръговата биоикономика. Настоящото проучване изследва производството на млечна киселина (LA) от сух зърнен остатък след получаване на етанол с разтворими вещества (DDGS), утайка от кафе (SCG), дървесни стърготини и суроватка, като се използват два щама: *Lactiplantibacillus plantarum* 53 и *Lactiplantibacillus plantarum* 2HS.

И двата щама са способни да асимилират захари от всички отпадъчни суровини.

Разработен е и експериментално е валидиран математичен модел, основан на уравненията на Gompertz и Luedeking–Piret.

Математическият модел на ферментационния процес включва диференциални уравнения, описващи клетъчния растеж, консумацията на субстрат и образуването на продукт.

За решаване на уравненията на модела, описващи процеса на ферментация е използван софтуерът MATLAB 2025b.

Разработването на надежден математически модел и точното определяне на неговите кинетични параметри са от решаващо значение за разбирането, прогнозирането, оптимизирането и мащабирането на ферментационните процеси.

От гледна точка на безопасността на храните, оптимизираното производство на млечна киселина подпомага естествените антимикробни интервенции срещу патогени, пренасяни чрез храната, включително *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* и *Listeria monocytogenes*, допринасяйки за по-безопасни системи за съхранение. В областта на здравето на животните, специфичното за щама производство на млечна киселина подобрява подкиселяването на фуража и качеството на силажа, като насърчава здравето на червата и

намалява зависимостта от антибиотици. По отношение на здравето на растенията, метаболитите, произвеждани от щамовете *L. plantarum*, проявяват антагонистична активност срещу патогени, пренасяни чрез почвата, като *Fusarium oxysporum*, подпомагайки стратегиите за биологичен контрол и подобрявайки микробния баланс в почвата. Като цяло, интегрирането на селекцията на щамове и кинетичното моделиране укрепват възможността за превръщане на агроиндустриалните остатъци в млечна киселина за многосекторни приложения в устойчиви хранителни и селскостопански системи.

Ключови думи: *производство на млечна киселина; L. plantarum; сух зърнен остатък след получаване на етанол с разтворими вещества; утайка от кафе; суроватка; дървесни стърготини, моделиране*



Kinetic Modeling and Comparative Evaluation of Lactic Acid Production from Agro-Industrial Wastes: Implications for Food Safety, Animal and Plant Health

*Greta Naydenova, Lili Dobрева, Svetla Danova, Petya Popova-Krumova
and Dragomir Yankov*
Institute of chemical engineering, BAS

The sustainable utilization of agro-industrial waste in high-value bio-products offers significant opportunities for strengthening the circular bioeconomy. This study investigates the production of lactic acid (LA) from dry grain residue after ethanol production with soluble substances (DDGS), coffee grounds (SCG), wood chips, and whey, using two strains: *Lactiplantibacillus plantarum* 53 and *Lactiplantibacillus plantarum* 2HS. Both strains are capable of assimilating sugars from all waste raw materials. A mathematical model based on the Gompertz and Luedeking-Piret equations has been developed and experimentally validated.

The mathematical model of the fermentation process includes differential equations describing cell growth, substrate consumption, and product formation.

MATLAB 2025b software was used to solve the model equations describing the fermentation process.

The development of a reliable mathematical model and the accurate

determination of its kinetic parameters are crucial for understanding, predicting, optimizing, and scaling fermentation processes.

From a food safety perspective, optimized lactic acid production supports natural antimicrobial interventions against foodborne pathogens, including *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, and *Listeria monocytogenes*, contributing to safer storage systems. In the field of animal health, strain-specific lactic acid production improves feed acidification and silage quality, promoting gut health and reducing antibiotic dependence. In terms of plant health, metabolites produced by *L. plantarum* strains exhibit antagonistic activity against soil-borne pathogens such as *Fusarium oxysporum*, supporting biological control strategies and improving microbial balance in the soil.

Overall, the integration of strain selection and kinetic modeling strengthens the potential for converting agro-industrial residues into lactic acid for multi-sector applications in sustainable food and agricultural systems.

Key words: *lactic acid production; L. plantarum; distiller's dried grains; spent coffee grounds; whey; wood hydrolysate, modeling*

Kinetic Modeling and Comparative Evaluation of Lactic Acid Production from Agro-Industrial Wastes: Implications for Food Safety, Animal and Plant Health

Petya Popova-Krumova¹, Greta Naydenova¹, Lili Dobрева², Svetla Danova², Dragomir Yankov¹

¹ Institute of Chemical Engineering, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria

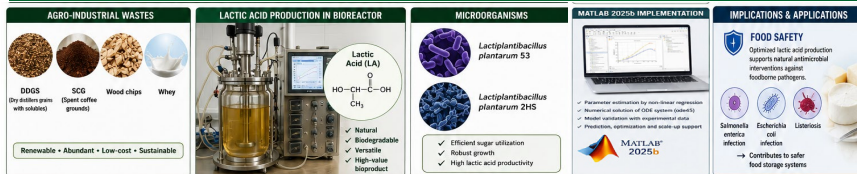
² The Stephan Angeloff Institute of Microbiology, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria

INTRODUCTION

The sustainable utilization of agro-industrial waste for the production of high-value bioproducts offers significant opportunities to strengthen the circular bioeconomy. This study investigates lactic acid (LA) production from dry distillers grains with solubles (DDGS), spent coffee grounds (SCG), wood chips, and whey using two bacterial strains, *Lactiplantibacillus plantarum* JS3 and *Lactiplantibacillus plantarum* 2HS. Both strains demonstrated the ability to assimilate sugars derived from all investigated waste substrates. A mathematical model based on the Gompertz and Luëckeding-Pirt equations was developed and experimentally validated. The fermentation model includes differential equations describing microbial growth, substrate consumption, and lactic acid formation. The model equations were solved using MATLAB 2025b software. The development of a reliable mathematical model and the accurate determination of kinetic parameters are essential for understanding, predicting, optimizing, and scaling fermentation processes. From a food safety perspective, optimized lactic acid production supports natural antimicrobial interventions against foodborne pathogens, including *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* infection, and *Listeria monocytogenes*, thereby contributing to safer food storage systems.

In the field of animal health, strain-specific lactic acid production enhances feed acidification and silage quality, promoting gut health and reducing dependence on antibiotics. Regarding plant health, metabolites produced by *L. plantarum* strains exhibit antagonistic activity against soil-borne pathogens such as *Fusarium oxysporum*, supporting biological control strategies and improving soil microbial balance.

Overall, the integration of strain selection and kinetic modeling enhances the potential for converting agro-industrial residues into lactic acid with applications across sustainable food and agricultural systems.



KINETIC MODELING APPROACH

Gompertz equation:

$$X(t) = X_0 + \frac{A}{1 + \exp\left[\frac{4A}{\Delta t_{max}}(\lambda - t) + 2\right]}$$

Luëckeding-Pirt model for lactic acid production:

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X$$

Substrate consumption:

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{L/S}} \frac{dX}{dt} - \frac{1}{Y_{P/S}} \frac{dP}{dt} - m_x X$$

$$t = 0, \quad P = P_0, \quad S = S_0$$

The purpose of the present investigation was to select LAB strains capable of assimilating sugars present in various waste materials, to study the kinetics, and to model the lactic acid production process. The waste streams included dilute-acid and enzymatic hydrolysates from DDGS and SCG, cheese whey, and a by-product stream from the Kraft process used in cellulose production from wood. A mathematical model of the fermentation process includes a set of coupled differential equations describing cell growth, substrate consumption, and product formation.

The model equations were solved using MATLAB 2025b software

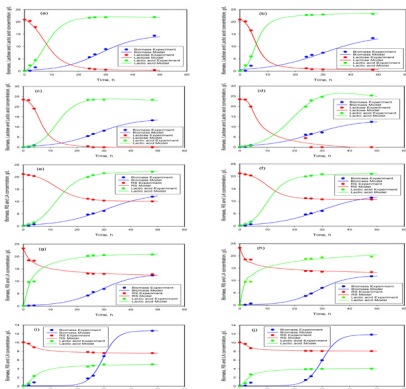
Initially, the parameters in the modified Gompertz model (μ_{max} , A , λ) are determined using experimental cell concentration data by minimizing the least squares function Q_1 defined as the sum of the squared differences between the measured biomass and the biomass calculated by the model.

$$Q_1(\mu_{max}, A, \lambda) = \sum_{j=1}^N (X_j - X_j^{exp})^2 \rightarrow \min$$

$$Q_2(Y_{L/S}, Y_{P/S}, \alpha, \beta) = \sum_{j=1}^N (S_j - S_j^{exp})^2 + \sum_{j=1}^N (P_j - P_j^{exp})^2 \rightarrow \min$$

The values of the Q functions show a good agreement between the model and the experimental data. The high determination coefficients (R^2 from 0.98 to 0.99) demonstrated the goodness of fit of the model.

Results and discussion



Experimental and model results for microbial growth, substrate consumption, and lactic acid production from different carbon sources: lactose (a and b), whey (c and d), SCG (e and f), DDGS (g and h), and WH (i and j) by *L. plantarum* JS3 (a, c, e, g, i, k) and *L. plantarum* 2HS (b, d, f, h, j, l).

Strain	Model parameters											
	time	A	λ	Y _{L/S}	Y _{P/S}	α	β	Q ₁	Q ₂	R ²	R ²	
<i>L. plantarum</i> JS3	1	0.513	14.531	13.866	0.276	2.573	7.022	0.009	0.1895	0.2837	0.9950	0.9986
	2	0.472	13.985	12.569	0.156	2.361	5.142	0.010	0.0696	0.5467	0.9984	0.9984
	3	0.394	13.427	13.492	0.157	5.407	12.564	0.009	0.0309	0.0219	0.9985	0.9998
	4	1.174	12.623	24.249	0.580	4.493	3.470	0.010	0.1013	0.0335	0.9914	0.9986
<i>L. plantarum</i> 2HS	5	4.890	12.864	15.504	0.313	2.312	7.156	0.008	0.1231	1.2410	0.9950	0.9861
	1	0.383	14.583	10.922	0.250	2.393	7.025	0.011	0.215	0.2347	0.9973	0.9889
	2	0.405	13.129	10.580	0.455	3.541	7.701	0.018	0.1505	0.9457	0.9889	0.9920
	3	0.376	12.590	12.975	0.191	4.050	10.349	0.006	0.1326	0.0212	0.9912	0.9998
	4	1.033	11.769	24.332	0.349	4.751	5.712	0.016	0.0421	0.0706	0.9866	0.9963
	5	0.544	11.978	17.448	0.2488	1.122	7.992	0.006	0.0874	1.2025	0.9920	0.9844

The possibility of using waste materials for lactic acid production was tested in the present study. Different raw materials were used – DDGS, SCG, wood hydrolysate, and whey. A mathematical model based on the modified Gompertz equation and the Luëckeding-Pirt equations was used to model experimental data, with excellent agreement. The parameter values calculated by the model were of the same order of magnitude across all cases.

WHY THIS STUDY MATTERS

- Converts low-value agro-industrial wastes into high-value lactic acid
- Integrates strain selection with kinetic modeling
- Advances circular bioeconomy and sustainability
- Delivers multi-sector benefits for food, animal and plant health

CONCLUSION

The integration of strain selection and kinetic modeling enhances the potential for converting agro-industrial residues into lactic acid for multi-sector applications in sustainable food and agricultural systems.

Acknowledgment: The authors gratefully acknowledge the funding of grant PUV-63 BG-RRP-2.017-0047-C01.

Лигноцелулозни отпадъци като устойчив източник на ферментируеми захари за производство на биоактивни съединения с приложение в безопасността на храните

*Грета Найденова, Драгомир Янков
Институт по инженерна химия, БАН*

Изграждането на доверие в хранителната система изисква научно обосновани решения, гарантиращи едновременно безопасност, устойчивост и висока добавена стойност. В контекста на мотото „Доверие чрез наука“, настоящото изследване представя систематичен подход за оползотворяване на агроиндустриални отпадъци като алтернативен въглероден източник за получаване на биопродукти с потенциално приложение в безопасността на храните.

Проучен е потенциалът на различни лигноцелулозни и органични странични продукти – DDGS (Distillers Dried Grains with Solubles), утайка от кафе, и слънчогледови люспи след предварителна обработка и хидролиза. Определени са количествата редуциращи захари и е направен сравнителен анализ на ефективността на хидролитичните процеси. Получените данни демонстрират различна степен на освобождаване на въглехидрати, като DDGS показват най-висок захарен добив.

Хидролизат, получен от DDGS, е използван като въглероден източник при ферментация с представители на род *Lactobacillus* spp., при което е проследена кинетиката на растеж и натрупване на млечна киселина. Резултатите потвърждават ефективна биоконверсия на освободените захари до млечна киселина – естествен антимикробен агент, широко използван като регулатор на киселинността и консервант в хранителната индустрия.

Получената млечна киселина и съпътстващите метаболити (метабиотици) притежават потенциал за приложение като естествени средства за контрол на микробния растеж, което допринася за повишаване на микробиологичната безопасност на храните. Чрез интегриране на устойчиво управление на отпадъците и производство на биоактивни съединения, изследването демонстрира как научно валидираните биотехнологични решения могат да укрепят доверието в хранителната верига.

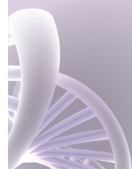
Настоящият подход съчетава кръгова биоикономика, контрол на риска и иновативни ферментационни технологии, като по този начин допринася за изграждането на устойчиви и безопасни хранителни системи, основани на доказателства и прозрачност.

Колективът изразява благодарност за финансирането на грант ПВУ-63 BG-RRP-2.017-0047-C01. Грета Найденова изразява благодарност за финансирането на договор КП-06-M87/3 от 06.12.2024г.

Ключови думи: *лигноцелулозни отпадъци, евтин субстрат, микробна ферментация, устойчиви и безопасни хранителни системи*

**Lignocellulosic waste as a sustainable source of fermentable sugars
for the production of bioactive compounds with
applications in food safety**

Greta Naydenova, Dragomir Yankov
Institute of chemical engineering, BAS



Building trust in the food system requires science-based solutions that simultaneously ensure safety, sustainability, and high added value. In the context of the motto “Trust through Science,” the present study proposes a systematic approach for the valorization of agro-industrial residues as alternative carbon sources for the production of bioproducts with potential applications in food safety.

The potential of various lignocellulosic and organic by-products – DDGS (Distillers Dried Grains with Solubles), spent coffee grounds (SCG), and sunflower husks (SH) – was investigated following appropriate pretreatment and hydrolysis. The concentrations of reducing sugars were quantified, and a comparative assessment of hydrolytic efficiency was performed. The results demonstrated substrate-dependent variability in carbohydrate release, with DDGS exhibiting the highest sugar yield among the tested materials.

The hydrolysate derived from DDGS was subsequently used as a carbon source for fermentation with representatives of the genus *Lactobacillus* spp., and the kinetics of microbial growth and lactic acid production were monitored. The findings confirmed the efficient bioconversion of liberated sugars into lactic acid – a natural antimicrobial agent widely applied in the

food industry as an acidity regulator and preservative.

The produced lactic acid, together with associated metabolites (metabiotics), demonstrates potential as a natural means of controlling microbial growth, thereby contributing to enhanced microbiological food safety. By integrating sustainable waste management with the production of bioactive compounds, this study illustrates how scientifically validated biotechnological solutions can strengthen trust across the food value chain. The proposed approach combines principles of the circular bioeconomy, risk control, and innovative fermentation technologies, ultimately supporting the development of sustainable and safe food systems grounded in evidence and transparency.

The authors gratefully acknowledge the funding of the grant PVU-63 BG-RRP-2.017-0047-C01. Greta Naydenova gratefully acknowledges the financial support provided under Contract No. KP-06-M87/3 of 06 December 2024.

Key words: *lignocellulosic waste, Low-cost substrate, Microbial fermentation, Sustainable and safe food systems*

18th SCIENTIFIC CONFERENCE OF THE BULGARIAN FOCAL POINT OF EFSA

LIGNOCELLULOSIC WASTE AS A SUSTAINABLE SOURCE OF FERMENTABLE SUGARS FOR THE PRODUCTION OF BIOACTIVE COMPOUNDS WITH APPLICATIONS IN FOOD SAFETY

Greta Naydenova, Dragomir Yankov

Institute of Chemical Engineering, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria

Introduction

Building trust in food systems requires science-based solutions that integrate safety, sustainability, and high added value. In line with the motto "Trust through science", this study explores the valorization of agro-industrial residues as alternative carbon sources for the production of bioactive compounds relevant to food safety. Lignocellulosic and organic by-products, including DDGS, coffee grounds, and sunflower husks, were investigated through pretreatment and hydrolysis, with evaluation of reducing sugar release.



Objective

The aim of this study is to evaluate the efficiency of different lignocellulosic substrates for reducing sugar production and their application as carbon sources for *Lactobacillus* spp. fermentation for lactic acid and bioactive metabolite production, with potential to enhance food microbiological safety.

Materials and Methods

Raw materials:

Lignocellulosic substrates: DDGS (distillers grains), sunflower hulls (SH) and spent coffee grounds (SCG).

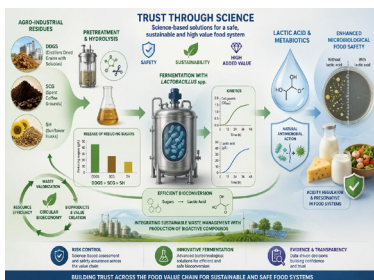
Two-stage hydrolysis process:

Stage I – Pretreatment conditions

- Solid loading: 10% (w/v)
- Volume: 60 mL
- Two approaches:
 - Hydrothermal treatment: distilled water, 1 atm, 2 h (autoclave)
 - Acid hydrolysis: 1% H₂SO₄, same conditions
- Liquid fractions collected for HPLC analysis
- Solid residues washed (~500 mL distilled water), washings also analyzed

Stage II – Enzymatic hydrolysis

- Enzyme: cellulase (1 g/L)
- Conditions: pH 4.5, 1 atm, 1 h
- Solid loading: 10% (w/v)



Materials and Methods

Analytical methods:

- Reducing sugars determined by Bertrand method
- Sugars profile analyzed by HPLC

Fermentation experiment:

- Microorganisms: *Lactobacillus* spp.
- Medium: MRS (without lactose in experimental variants, and with 11 g/L lactose for control)
- Temperature: 37° C, static cultivation
- Volume: 125 mL



RESULTS AND DISCUSSIONS



CONCLUSIONS

The two-stage processing of lignocellulosic raw materials through hydrothermal or acid hydrolysis followed by enzymatic hydrolysis is an effective strategy for producing reducing sugars with distinct technological profiles. Acid hydrolysis provides higher yields but generates inhibitory compounds, whereas hydrothermal treatment produces cleaner hydrolysates that are suitable for biotechnological applications. Enzymatic hydrolysis further enhances sugar yield and improves carbohydrate utilization efficiency.

Fermentation experiments with *Lactobacillus* spp. confirm that the obtained hydrolysates are suitable substrates for efficient lactic acid production, supporting stable biomass growth and complete sugar consumption. The results clearly demonstrate that the optimal balance between yield and substrate purity is crucial for successful application in sensitive bioprocesses.

Overall, the study highlights that sustainable biomass valorization depends not only on extraction efficiency but also on strict control of product quality and safety. This science-based control from raw material to final bioproduct forms the foundation of reliable and safe solutions in biotechnology and food safety.

- Acid hydrolysis yields higher reducing sugar concentrations (up to 95.17 g/L for DDGS), but generates inhibitory compounds that may limit fermentation efficiency.
- Hydrothermal extraction results in lower sugar yields, yet produces cleaner hydrolysates with improved suitability for biotechnological applications.
- Enzymatic hydrolysis significantly enhances sugar release, confirming the effectiveness of the two-stage process.
- Although the highest-yield hydrolysate (DDGS, acid + enzymatic) was used for fermentation, future research should focus on hydrothermal + enzymatic processing as a more balanced and sustainable strategy.



- *Lactobacillus* spp. efficiently utilized the DDGS hydrolysate (acid + enzymatic), with complete glucose consumption within 24 h.
- Lactic acid production reached ~20.8 g/L, accompanied by a pH decrease from 5.34 to ~3.5, indicating active homolactic metabolism.
- A steady increase in biomass (up to ~11.8 g/L) confirmed good compatibility of the detoxified hydrolysate.
- Despite the high performance, the need for detoxification highlights limitations of acid hydrolysis and supports the future implementation of cleaner hydrolysates in biotechnological applications.



ACKNOWLEDGEMENTS The authors gratefully acknowledge the funding of grant PVU-63 BG-RRP-2.017-0047-C01. Greta Naydenova gratefully acknowledges the financial support provided under Contract No. KP-06-M87/3 of 06 December 2024.

Дигитален анализ на семена в системата за устойчиво управление на растителните генетични ресурси в България

Николая Велчева, Гергана Дешева, Вълко Нешев

Институт по растителни генетични ресурси – Садово

Генофондът е национално богатство – ресурс с висока екологична, биологична и стопанска стойност, изходен материал за създаването на нови сортове, адаптирани към климатичните промени и съответстващи на изискванията на настоящите и бъдещи поколения. Националната генбанка в Садово е основен център за дългосрочно съхранение на растителни генетични ресурси в България и като такъв е партньор в международната система за опазване на биоразнообразието и следва стандарти на FAO (2014). По проект IS-PGR-SADOVO „Интелигентна система за управление на българския растителен генофонд, съхранен в генбанката на ИРГР-Садово“, финансиран от Фонд „Научни изследвания“ (Договор КП-06-Н86/9/09.12.2024 г.) са закупени иновативни измервателни системи за анализ на семена – MARViN VisionLine и MARViN SmartLine, които намират широко приложение в съхранението на растителни генетични ресурси. Чрез сканиране на пробите с висока резолюция и специализиран софтуер за обработка на информацията, оборудването позволява бързо и прецизно определяне на морфологичните признаци: размер, форма, цвят, брой на семената и др. Това подпомага оценката на качеството, хомогенността и жизнеспособността на образците. Използването на тази апаратура повишава ефективността на работата в генбанката, намалява субективния фактор при анализа, осигурява проследяемост и дигитално архивиране на данните и цветовете изображения. Не на последно място, при анализа семената остават не разрушени, годни за съхранение, репродукция или провеждането на други изследвания. Във връзка с дисертационна тема е анализирана колекция от фасул (*Phaseolus vulgaris* L.) с разнообразен местен и чужд произход. Създадената база данни допълва паспортната характеристика и полската оценка. Отличени са интересни образци, демонстриращи добър комплекс от фенологични характеристики, което подчертава значението на кураторските колекции, съхранени в генбанката, за селекцията и практиката.

Ключови думи: *растително разнообразие, генбанка, фенотипиране, бази данни, използване*

Digital seed analysis in the system for sustainable management of plant genetic resources in Bulgaria

Nikolaya Velcheva, Gergana Desheva, Valko Neshev

Institute of plant genetic resources – Sadovo

The gene pool is a national treasure—resource with ecological, biological, and economical value. It serves as fundamental source material for development of new varieties climate change adapted and meeting needs of present and future generations. The National Genebank in Sadovo is the main center for long-term conservation of plant genetic resources in Bulgaria. As a key institution within the national system for biodiversity conservation, it is a partner in international networks for biodiversity preservation and follows standards of FAO (2014). Under the project IS-PGR-SADOVO of the National Science Fund (Contract KP-06-H86/9/09.12.2024), innovative seed analysis systems – MARViN VisionLine and MARViN SmartLine – were acquired. These systems have broad applications in plant genetic resources conservation. Through high-resolution sample scanning and specialized data-processing software, the equipment enables rapid and precise determination of morphological traits such as seed size, shape, color, number of seeds, and other parameters. This supports assessment of accession quality, homogeneity, and viability. The use of this equipment increases the efficiency of genebank operations, reduces subjectivity in analysis, and ensures traceability and digital archiving of data and color images. Importantly, the seeds remain non-destructive during analysis, preserving their suitability for storage, regeneration, or further research. Within the framework of doctoral dissertation, a collection of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with diverse local and foreign origin was analyzed. The created database complements the passport data and field evaluation of accessions. Genotypes demonstrating a complex valuable phenological traits were identified, highlighting the importance of curator genebank collections for crop breeding and agricultural practice.

Key words: *plant diversity, genebank, phenotyping, databases, utilization*



Антиоксидантен потенциал и общо количество полифеноли в слънчогледови люспи – изобилен отпадък от хранително-вкусовата промишленост

Флора Цветанова, Станислава Бояджиева, Грета Найденова
Институт по инженерна химия, БАН

Поради нарастващият интерес към използването на продукти с природен произход и във връзка с Европейската директива за нулев отпадък, учените все повече насочват своя интерес към изучаването и валоризирането на изобилна отпадна биомаса от хранително-вкусовата промишленост. Един такъв пример са слънчогледовите люспи, които представляват около 20-30% от цялата семка (семка+обвивка) и са отпаден продукт от производството на слънчогледово олио. Те съдържат въглехидрати, протеини, липиди, терпенови алкохоли, стероли, флавоноиди и фенолни киселини. В контекстът на поддържане на човешкото здраве, особено значение имат фенолните съединения. Около 0.7-5.4% от тях са концентрирани в люспата, което прави този отпаден продукт потенциален източник на ценни биоактивни компоненти. Фенолните съединения проявяват широка гама биоактивности, като антиоксидантна, противоалергична, противовъзпалителна, антимикробна, антитромботична и други.

Тази работа е фокусирана върху изследването на антиоксидантния капацитет на екстракти, получени чрез сокслет екстракция на слънчогледови люспи. За извличането на фенолните съединения са избрани зелени разтворители (етанол и вода), които, освен че са безопасни за човешкото здраве, не вредят и на околната среда. Определени са общото количество полифеноли чрез използване на метода на Folin-Ciocalteu и антиоксидантната активност на получените екстракти чрез DPPH метод.

Слънчогледовите люспи са ценен и евтин източник на природни антиоксиданти, необходими за поддържане на здравето. Също така, фенолните съединения могат да бъдат влагани в храни и хранителни добавки в ролята им на стабилизатори и антиоксиданти вместо синтетично получени такива. Оползотворяването на този отпаден продукт затваря веригата на кръговата био-икономика.

Ключови думи: *отпадна биомаса, антиоксидантна активност, полифенолни съединения, нулев отпадък*

Antioxidant capacity and total polyphenolic content of sunflower seed hulls – a plentiful biowaste from the food industry

Flora Tsvetanova, Stanislava Boyadzhieva, Greta Naydenova

Institute of chemical engineering, BAS

Due to the growing interest in the use of natural products and in accordance with the European Zero Waste Directive, scientists are increasingly focusing their attention on studying and valorizing the abundant waste biomass from the food industry. Such examples include sunflower hulls, which account for about 20-30% of the entire seed (seed + shell) and are a waste product of sunflower oil production. They contain carbohydrates, proteins, lipids, terpene alcohols, sterols, flavonoids, and phenolic acids. In the context of maintaining human health, phenolic compounds are of particular importance. About 0.7-5.4% of them are concentrated in the hulls, making this waste product a potential source of valuable bioactive components. Phenolic compounds exhibit a wide range of bioactivities, such as antioxidant, antiallergic, anti-inflammatory, antimicrobial, antithrombotic, and others.

This work focuses on determining the antioxidant capacity of extracts obtained by Soxhlet extraction of sunflower hulls. Green solvents (ethanol and water) were selected for the extraction of phenolic compounds, which, in addition to being safe for human health, do not harm the environment. The total amount of polyphenols was determined using the Folin-Ciocalteu method, and the antioxidant activity of the extracts obtained was determined using the DPPH method.

Sunflower hulls are a valuable and inexpensive source of natural antioxidants necessary for the maintenance of human health. Furthermore, phenolic compounds can be used in foods and food supplements as stabilizers and antioxidants, rather than synthetically produced ones. The utilization of this waste product closes the circular bio-economy loop.

Key words: *waste biomass, antioxidant activity, polyphenolic compounds, zero waste*

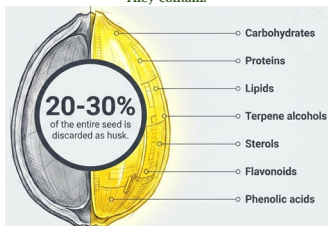


ANTIOXIDANT CAPACITY AND TOTAL POLYPHENOLIC CONTENT OF SUNFLOWER SEED HULLS – A PLENTIFUL BIOWASTE FROM THE FOOD INDUSTRY



Due to the growing interest in the use of natural products and in accordance with the European Zero Waste Directive, scientists are increasingly focusing their attention on studying and valorizing the abundant waste biomass from the food industry. Such examples include sunflower hulls - a waste product of sunflower oil production.

They contain:

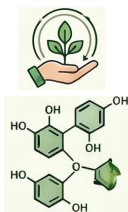


Phenolic compounds exhibit a wide range of bioactivities, such as **antioxidant**, **antiallergic**, **anti-inflammatory**, **antimicrobial**, **antithrombotic**, and others.

High phenolic concentration

Hulls contain about 0.7-5.4% phenolic compounds, making this waste product a potential source of valuable bioactive components.

Synergistic analytical methods confirm both the concentration and functional efficacy of the extract

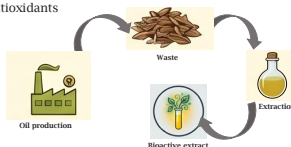


	Folin-Ciocalteu Method	DPPH Radical Method
What it measures	Total volume of polyphenols in the extract.	Antioxidant activity of the extract.
Scientific Goal	Quantitative analysis (Determining the precise concentration of bioactive substances).	Functional analysis (Proving their actual ability to neutralise free radicals).

The two methods work in synergy to prove not just presence, but real-world effectiveness of the extracted antioxidants

Circular Bio-economy:

Valorizing this bio-waste aligns with the European Zero Waste directive, turning industrial waste into a health-promoting resource.



This work focuses on determining the antioxidant capacity of extracts obtained by Soxhlet extraction of sunflower hulls. Green solvents (ethanol and water) were selected for the extraction of phenolic compounds, which, in addition to being safe for human health, do not harm the environment.

The total amount of polyphenols was determined using the Folin-Ciocalteu method, and the antioxidant activity of the extracts obtained was determined using the DPPH method.

COMPARATIVE EXTRACTION RESULTS (Ethanol vs. Water)

Solvent	Yield (%)	TPC (mg GAE/gde)	IC50 (g/l)
Ethanol (EtOH)	4.21	21.60	2.38
Water (H2O)	6.83	38.63	0.72

Superiority of aqueous extraction:

Water yielded the highest total phenolic content and the strongest antioxidant activity (indicated by the lowest IC50 value).

Natural alternatives to synthetics:

Phenolic compounds from hulls can replace synthetic stabilizers and antioxidants in food and supplements.

In the context of maintaining human health, phenolic compounds are of particular importance.

Sunflower hulls are a valuable and inexpensive source of natural antioxidants necessary for the maintenance of human health. Furthermore, phenolic compounds can be used in foods and food supplements as stabilizers and antioxidants, rather than synthetically produced ones. The utilization of this waste product closes the circular bio-economy loop.

The authors gratefully acknowledge the Bulgarian National Science Fund for its financial support via the contract for project for young scientists K17-06-M87/3.

**Проучване на антибактериалния потенциал на водната
бактериална съобщност при култивирането на нилска тилапия
и босилек в аквапонна система**

Невен Терзиев¹, Чигдем Юркю²

*1 Тракийски университет, Аграрен факултет, 2 Истанбулски
университет, Факултет по водни науки*

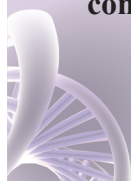
Общо прието е, че босилекът (*Ocimum basilicum*) притежава антибактериални свойства. Целта на това проучване беше да се извърши скрининг на микробните съобщества, способни на стабилен растеж и размножаване във водната среда по време на процеса на отглеждане на босилек в аквапоника, които може да играят важна роля за подобряване на здравето на рибите в системата. Въз основа на MALDI-TOF MS анализ беше установено наличието на пробиотични бактерии, принадлежащи към родовете *Lactococcus lactis* и *Bacillus* spp. In vitro оценката на тези бактериални видове беше извършена с помощта на диско-дифузионен метод срещу грам положителни и грам отрицателни бактерии. Резултатите показват, че изолираните пробиотични микроорганизми не показват антибактериален потенциал срещу *Aeromonas hydrophila* и *A. veronii*, но демонстрират ефикасност срещу *Lactococcus garvieae*. Резултатите от настоящото проучване показват, че аквапонните системи притежават потенциал и могат да бъдат използвани за производство на живи пробиотични култури.

Ключови думи: *аквапонна система, босилек, пробиотик, тилапия*

Investigation the antibacterial potential of the aquatic bacterial community in the cultivation of nile tilapia and basil in an aquaponics system

Neven Terziev¹, Çiğdem Ürkü²

1 Thracian University, Faculty of Agriculture, 2 Istanbul University, Faculty of Aquatic Science



It is widely accepted that the basil (*Ocimum basilicum*) possesses with antibacterial properties. The objective of this study was to screen for microbial communities capable of stable growth and reproduction in water during the cultivation process of basil in an aquaponics, which may play a significant role in enhancing fish health within the system. Based on MALDI-TOF MS analysis revealed the presence of probiotic bacteria *Lactococcus lactis* and *Bacillus* spp. The in vitro evaluation of these bacterial species was undertaken using the disk diffusion method against Gram positive and negative bacteria. The results indicated that the probiotic microorganisms, when isolated, exhibited no antibacterial potential against *Aeromonas hydrophila* and *A. veronii* however, they demonstrated efficacy against bacteria *Lactococcus garvieae*. The results of current study suggest that in the aquaponics systems have the potential to be used for the purpose of producing live probiotic cultures.

Key words: *aquaponics system, basil, probiotic, tilapia*

ISOLATION AND ANTAGONISTIC EVALUATION OF POTENTIAL PROBIOTIC BACTERIA FROM NILE TILAPIA-BASIL IN AN AQUAPONIC SYSTEMS

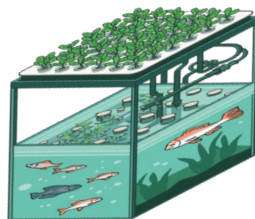
Neven Terziev and Çiğdem Ürkü

Trakia University, Faculty of Agriculture, Bulgaria
Istanbul University, Faculty of Aquatic Sciences, Türkiye

Introduction

The potential of probiotic candidates has been the subject of evaluation across a range of environments, including semi-intensive systems, river-based floating cages, farm cultures, and natural lakes (Chantharasophon et al., 2011; Chemlal-Kherras et al., 2012). Recent studies have demonstrated an increasing number of investigations focusing on the utilisation of probiotics within aquaponic systems (Jossefa et al., 2024; Rudoy et al., 2025).

The objective of this study was to isolate and identify bacteria with the potential to be classified as probiotics from water samples collected from an aquaponic system that was cultivating tilapia and basil. Furthermore, the antagonistic effects of the probiotics that were identified as candidates against fish pathogens, including *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* and *Lactococcus garvieae*, were evaluated



Material and method

Tank water samples from the aquaponic system were collected into sterile 250 mL Erlenmeyer flasks. The samples were serially diluted (1:9, 1:99, and 1:999) using sterile distilled water. From each dilution, 200 µL aliquots were spread onto Tryptic Soy Agar (TSA) plates using sterile Drigalski spatulas, and all procedures were performed in triplicate. The inoculated plates were incubated at 22 °C for 24–48 hours. Following incubation, bacterial colonies were evaluated based on their morphological characteristics, including color, shape, and margin.

For MALDI-TOF MS analysis, a single colony from each purified isolate was transferred onto a 96-spot polished steel UV-absorbing MALDI-TOF target plate.

Results

The antagonistic activity of candidate probiotic bacteria (*B. mycoides*, *B. marisflavi*, *B. thuringiensis*, and *L. lactis*) isolated from aquaponic system water was evaluated against fish pathogens using the disc diffusion method. The results showed that none of the tested probiotic candidates produced inhibition zones against *A. hydrophila* or *A. caviae*, indicating a lack of antibacterial activity against these pathogens.

In contrast, *B. thuringiensis* exhibited a clear inhibition zone with a diameter of 2.3 cm against *L. garvieae*, demonstrating a strong antagonistic effect. No inhibition zone was observed in the negative control, confirming that the antibacterial activity was associated with metabolites present in the cell-free supernatants (Figure).

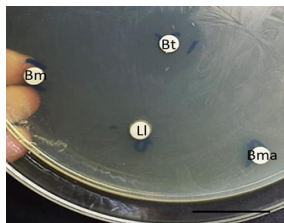


Figure: Antagonistic activity of candidate probiotic bacteria against *L. garvieae* determined by the disc diffusion method. No inhibition was observed *B. mycoides* (Bm), *B. marisflavi* (Bma), and *L. lactis* (Li) while *B. thuringiensis* (Bt) showed a 2.3 cm inhibition zone against *L. garvieae*. (Bar:2.5 cm)

Furthermore, the positive control, oxytetracycline, produced inhibition zones of 2.1 cm, 1.8 cm, and 1.7 cm against *A. hydrophila*, *A. caviae*, and *L. garvieae*, respectively. Overall, these findings indicate that among the tested probiotic candidates, *B. thuringiensis* exhibits selective antibacterial activity with notable effectiveness against *L. garvieae*.

In conclusion, the findings suggest that aquaponic systems cultivating basil harbor beneficial microbial communities, and *B. thuringiensis* in particular shows promise as a probiotic candidate for controlling *L. garvieae* and improving aquaculture health management.

18th Scientific Conference of the Bulgarian Focal Point of EFSA
14 May 2026, Sofia, Bulgaria

***Potentilla reptans* - потенциално антиоксидантно действие върху яйцеклетките**

Ваня Димитрова

Институт по Биология и имнология на размножаването
„Акад. Кирил Братанов“, Българска Академия на науките

В научните изследвания все повече навлизат лечебните растения, заради техните уникални комбинации от органични вещества. Растението *Potentilla reptans*, известно още като пълзящ петопръсник от рода Rosaceae се използва в традиционната медицина, заради своите биологично активни вещества и ценни фармакологични свойства. Те включват различни фитохимикали, феноли и органични вещества, които се локализират в различни части на растението. В традиционната медицина се прилага за лечение на множество инфекции, възпаления и други заболявания, като се използват различни части на растението (листа или корен). При направен химичен анализ на растението са установени предимно фенолни съединения и флавоноиди. *Potentilla reptans* има доказани антибактериални, антивирусни ефекти, силно антиоксидантно действие върху лабораторни животни (мишки и плъхове) и човек. В тази връзка, проучваното растение с неговите антиоксидантни свойство има главна роля към функционирането на женската полова система. Влиянието им се изразява в улавяне на свободни радикали и действат като кофактор за специфични ензими, а те от своя страна участват в клетъчната диференция. Антиоксидантния фактор има отношение и към оксидативния стрес, които може да доведе до стареене на яйцеклетките, съответно намаляване качеството на ооцитите. Данни сочат, че пълзящ петопръсник може да регулира нивата на свободните радикали и по този начин да предпазват от увреждане важни клетъчни компоненти.

Ключови думи: *Potentilla reptans*, яйцеклетки, лечебни растения, антиоксиданти

***Potentilla reptans*—potential antioxidant effect on oocytes**

Vanya Dimitrova

Institute of Reproduction Biology and Immunology “Acad. Kiril Bratanov”, Bulgarian Academy of Sciences

Medicinal plants are increasingly being used in scientific research because of their unique combinations of organic substances. The plant *Potentilla reptans*, also known as creeping cinquefoil of the Rosaceae family, is used in traditional medicine because of its biologically active substances and valuable pharmacological properties. These include various phytochemicals, phenols, and organic substances that are found in different parts of the plant. In traditional medicine, it is used to treat a variety of infections, inflammations, and other diseases, using different parts of the plant (leaves or root). Chemical analysis of the plant has revealed mainly phenolic compounds and flavonoids. *Potentilla reptans* has proven antibacterial and antiviral effects, as well as a strong antioxidant effect on laboratory animals (mice and rats) and humans. In this regard, the studied plant with its antioxidant properties plays a major role in the functioning of the female reproductive system. Their effect is expressed in the capture of free radicals and they act as a cofactor for specific enzymes, which in turn participate in cell differentiation. The antioxidant factor is also related to oxidative stress, which can lead to egg aging and a decrease in oocyte quality. Data indicate that creeping cinquefoil can regulate free radical levels and thus protect important cellular components from damage.

Key words: *Potentilla reptans, oocytes, medicinal plants, antioxidants*

Potentilla reptans—potential antioxidant effect on oocytes

Vanya Dimitrova

Institute of Biology and Immunology of Reproduction "Acad. Kiril Bratanov",
Bulgarian Academy of Sciences

Abstract:

Medicinal plants are increasingly being used in scientific research because of their unique combinations of organic substances. The plant *Potentilla reptans*, also known as creeping cinquefoil of the Rosaceae family, is used in traditional medicine because of its biologically active substances and valuable pharmacological properties. These include various phytochemicals, phenols, and organic substances that are found in different parts of the plant. In traditional medicine, it is used to treat a variety of infections, inflammations, and other diseases, using different parts of the plant (leaves or root). Chemical analysis of the plant has revealed mainly phenolic compounds and flavonoids. *Potentilla reptans* has proven antibacterial and antiviral effects, as well as a strong antioxidant effect on laboratory animals (mice and rats) and humans. In this regard, the studied plant with its antioxidant properties plays a major role in the functioning of the female reproductive system. Their effect is expressed in the capture of free radicals and they act as a cofactor for specific enzymes, which in turn participate in cell differentiation. The antioxidant factor is also related to oxidative stress, which can lead to egg aging and a decrease in oocyte quality. Data indicate that creeping cinquefoil can regulate free radical levels and thus protect important cellular components from damage.



Figure 1. *Potentilla reptans* - <https://www.first-mature.com/flowers/potentilla-reptans.php>; Germany, Sturm Flora von Deutschland (1900-1906) - *Potentilla reptans*)

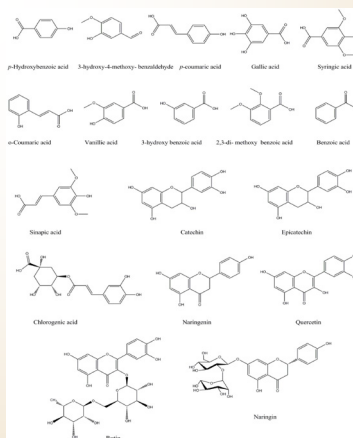


Figure 3. Phenolic compounds identified in *Potentilla* species.- Uysal et al., 2017

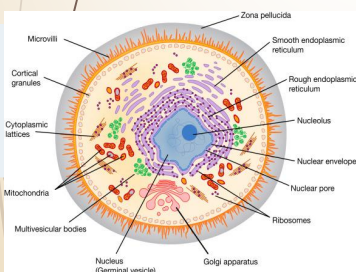


Figure 2 . Oocyte anatomy-Grover, et al., 2018

Conclusion: Plants of the genus *Potentilla* are used in pharmacology for their antibacterial and antiviral properties. Due to its rich phenolic content, *Potentilla reptans* exhibits high antioxidant activity in aqueous extracts, which is beneficial to the food and pharmaceutical industries. Due to its antioxidant properties, it has the potential to be used in reproductive biotechnology, as there is currently no data on such research. Through their antioxidant action, they regulate free radical levels and thus protect against oxidative stress, which can reduce egg quality and cause premature aging.

Acknowledgements: This research was funded by the National Programme "Education with science" (Agreement of the Ministry of education and Science of Bulgaria with the Bulgarian Academy of Sciences D01-172 / 18.09.2024)"

**Анализи на фитосанитарния риск от приоритетните вредители
по растенията – *Anoplophora glabripennis* и *Bactrocera dorsalis*,
включени в Регламент (ЕС) 2019/1702 на Комисията**

Николай Спасов и Татяна Величкова

Център за оценка на риска по хранителната верига

Европейската комисия публикува в края на 2019 г., списък с 20 регулирани карантинни вредители, които са класифицирани от панела по здраве на растенията към Европейския орган по безопасност на храните (ЕОБХ) като „приоритетни вредители“ и представляват най-сериозна икономическа, екологична и социална заплаха за страните от Европейския съюз (ЕС).

След влизане в сила на Регламент (ЕС) 2019/1702*, Центърът за оценка на риска по хранителната верига (ЦОРХВ) започна да изготвя анализи на фитосанитарния риск за тези приоритетни вредители, като до този момент на сайта на ЦОРХВ са публикувани 7 анализа за вредителите: *Spodoptera frugiperda*, *Aromia bungii*, *Popillia japonica*, *Anoplophora chinensis*, *Agrilus planipennis*, *Anoplophora glabripennis* и *Bactrocera dorsalis*. В настоящият постер са представени последните два вредителя, като към този момент тези вредители не присъстват на територията на България, но евентуалното им навлизане, установяване и разпространение би довело до икономически и екологични последици.

*Делегиран регламент (ЕС) 2019/1702 на Комисията от 1 август 2019 година за допълнение на Регламент (ЕС) 2016/2031 на Европейския парламент и на Съвета посредством установяване на списък на приоритетните вредители

Ключови думи: *Anoplophora glabripennis*, *Bactrocera dorsalis*

Phytosanitary risk analyses of priority plant pests – *Anoplophora glabripennis* and *Bactrocera dorsalis*, included in Commission Regulation (EU) 2019/1702

Nikolay Spasov and Tatyana Velichkova
Risk Assessment Center on Food Chain

At the end of 2019, the European Commission published a list of 20 regulated quarantine pests that have been classified by the European Food Safety Authority (EFSA) Panel on Plant Health as “priority pests” and pose the most serious economic, environmental, and social threat to European Union (EU) countries.

Following the entry into force of Regulation (EU) 2019/1702*, the Risk Assessment Center on Food Chain (RACFC) began preparing phytosanitary risk analyses for these priority pests. To date, seven analyses have been published on the RACFC website for the following pests: *Spodoptera frugiperda*, *Aromia bungii*, *Popillia japonica*, *Anoplophora chinensis*, *Agilus planipennis*, *Anoplophora glabripennis*, and *Bactrocera dorsalis*. This poster presents the last two pests, which are not currently present in Bulgaria, but their possible entry, establishment, and spread would have economic and environmental consequences.

* Commission Delegated Regulation (EU) 2019/1702 of 1 August 2019 supplementing Regulation (EU) 2016/2031 of the European Parliament and of the Council by establishing the list of priority pests

Key words: *Anoplophora glabripennis*, *Bactrocera dorsalis*



*Делегиран регламент (ЕС) 2019/1702 на Комисията от 1 август 2019 година за допълнение на Регламент (ЕС) 2016/2031 на Европейския парламент и на Съвета посредством установяване на списък на приоритетните вредители

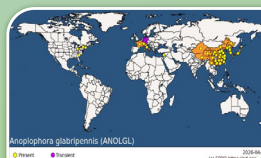
Разпространение към 20.04.2026 г., Европейската и средиземноморска организация за растителна защита (EPPO): Азия, Северна Америка и Европа (Австрия, Германия, Италия, Франция и Швейцария). *Anoplophora glabripennis* е полифag с широк кръг растения, които ги посещава в градска и горска среда.

Поведение от *A. globripennis* се дължи главно на храненето на ларвите в дървесината (галерии), а симптомите обикновено се откриват от 1,5 метра от земята до средата на короната на дървото (изходни отвори с диаметър около 10–15 mm). Възрастните индивиди увреждат листата, дръжките, кората на младите клонове (на възраст 1–3 години) и леторастите.

На база оценките за вероятността от навлизане и установяване, както и за степента на разпространение и въздействие, фитосанитарният риск за България от неприятеля *A. glabripennis* се определя като среден.



Оценка на риска от вредители за България	Висок риск	Среден риск	Нисък риск
Наличие на вредители в ЕС			
Птица за нахлуване		✓	
Климатични условия за установяване	✓		
Наличие на растения гостоприемници	✓		
Разпространение след установяване	✓		
Развитие след установяване			✓
Икономическо въздействие	✓		



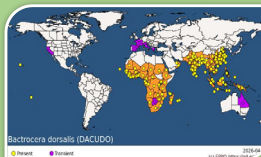
Разпространение към 20.04.2026 г., (ЕРРО): Азия, Африка, Северна Америка, Океания и Европа (Франция, Италия, Словакия и Австрия).

Основные растения-гостоприемники в Европе са: представители от род пипер (*Capsicum* spp.), цитрус (*Citrus* spp.), пъпеш (*Cucumis melo*), краставица (*Cucumis sativus*), домати (*Solanum lycopersicum*), ябълка (*Malus domestica*), вишна (*Prunus avium*), слива (*P. domestica*), праскова (*P. persica*) и патладжан (*Solanum melongena*).

На база оценките за вероятността от навлизане и установяване, както и за степента на разпространение и въздействие, фитосанитарния риск за България от неприятеля *Vactrosera dorsalis* се определя от нисък до среден, и то в ограничени райони на страната с преходно-континентален климат със средиземноморско влияние.



Оценка на риска от вредители за България	Висок риск	Среден риск	Нисък риск
Наличие на вредители в ЕС			✓
Птица за нахлуване	✓		
Климатични условия за установяване			✓
Наличие на растения гостоприемници	✓		
Разпространение след установяване	✓		
Развитие след установяване			✓
Икономическо въздействие	✓		



Снимков материал: *Anoplophora glabripennis* = <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC54051734/>; *Bactrocera dorsalis* = <https://doi.org/10.1079/cobipendium.5557>; <https://gd.eppo.int/taxon/ANQGLQ/distribution>; <https://gd.eppo.int/taxon/ANQGLQ/photos>; <https://www.gbif.org/occurrence/514051734>; <https://gd.eppo.int/taxon/DACUJO/distribution>; <https://link.springer.com/article/10.1007/s14269-019-00083-w>

Екологосъобразен синтез на наночастици от хематит чрез екстракт от семена на нахут (*Cicer arietinum*)

*Катерина Захариева¹, Марияна Георгиева², Петя Тодорова¹,
Росица Титоренкова¹, Лилия Цветанова¹, Валя Василева²*

¹ Институт по минералогия и кристалография „Акад. Иван Костов“, Българска академия на науките, ² Институт по физиология на растенията и генетика, Българска академия на науките

Нанотехнологиите в областта на селското стопанство са насочени към прецизното земеделие, което включва използването на наночастици с техните уникални свойства за повишаване на продуктивността и здравето на културните растения [1]. В настоящото изследване наночастици от хематит са получени чрез зелен синтез с екстракт от семена на *Cicer arietinum* L. subsp. *arietinum*, линия BG R 21208, посредством утаяване и последваща термична обработка при 500°C. Успоредно с това са синтезирани Fe₂O₃ наночастици, третирани с екстракт от семена. Фазовият състав и структурата на хематитови наночастици са изследвани чрез прахов рентгенов дифракционен анализ и инфрачервена спектроскопия. Семената и екстрактът от семена на *Cicer arietinum* L. са охарактеризирани чрез рентгенов флуоресцентен анализ и инфрачервена спектроскопия. Получените Fe₂O₃ материали са с наноразмери и имат среден размер на кристалитите 22-24 nm.

Благодарности: Настоящото изследване е проведено в рамките на Национална научна програма (ННП) „Критични и стратегически суровини за зелен преход и устойчиво развитие“, одобрена с Решение на МС № 508/18.07.2024 г и финансирана от Министерството на образованието и науката (К.З., Р.Т. and Л.Ц.). Работата е финансирана от програмата за научни изследвания и иновации „Хоризонт Европа“ на Европейския съюз по споразумение за отпускане на безвъзмездна финансова помощ № 101181400 (PROSPER). (М.Г. и В.В.)

Ключови думи: *Cicer arietinum* L., Fe₂O₃, екологосъобразен синтез

Eco-friendly synthesis of hematite nanoparticles using chickpea (*Cicer arietinum*) seed extract

*Katerina Zaharieva*¹, *Mariyana Georgieva*², *Petya Todorova*¹, *Rositsa*

*Titorenkova*¹, *Liliya Tsvetanova*¹, *Valya Vassileva*²

1 Institute of Mineralogy and Crystallography “Acad. Ivan Kostov”, Bulgarian Academy of Sciences, 2 Institute of Plant Physiology and Genetics, Bulgarian Academy of Sciences

Nanotechnology in the field of agriculture currently focuses on precision farming that involves the use of nanoparticles with their unique properties to enhance plant health and crop productivity [1]. In the present study, hematite nanoparticles were prepared by green synthesis approach using a seeds extract of *Cicer arietinum* subsp. *arietinum*, line BG R 21208, through precipitation followed by thermal treatment at 500°C. Additionally, Fe₂O₃ nanoparticles loaded with a seed extract were synthesised. The phase composition and structure of the hematite nanoparticles were characterised by powder X-ray diffraction and Fourier-transform infrared spectroscopy. The seeds and seeds extract of *Cicer arietinum* L. were investigated by X-ray fluorescence spectroscopy and Fourier-transform infrared spectroscopy. The prepared Fe₂O₃ materials are nanodimensional with a mean crystallite size of 22-24 nm.

Acknowledgments: This work has been carried out in the framework of the National Science Program “Critical and strategic raw materials for a green transition and sustainable development”, approved by the Resolution of the Council of Ministers № 508/18.07.2024 and funded by the Ministry of Education and Science of Bulgaria (K.Z., R.T. and L.T.). The work has received funding from the Horizon Europe research and innovation programme of the European Union under grant agreement No 101181400 (PROSPER) (M.G. and V.V.).

Key words: *Cicer arietinum* L., Fe₂O₃, eco-friendly synthesis

ECO-FRIENDLY SYNTHESIS OF HEMATITE NANOPARTICLES USING CHICKPEA (*Cicer arietinum*) SEED EXTRACT

Katerina Zaharieva¹, Mariyana Georgieva², Petya Todorova¹, Rositsa Titorenkova¹, Liliya Tsvetanova¹, Valya Vassileva²

¹Institute of Mineralogy and Crystallography "Acad. I. Kostov", Bulgarian Academy of Sciences, Acad. G. Bonchev St., Block 107, 1113 Sofia, Bulgaria

²Institute of Plant Physiology and Genetics, Bulgarian Academy of Sciences, Acad. G. Bonchev St., Block 21, 1113 Sofia, Bulgaria

GOAL

Nanotechnology in the field of agriculture currently focuses on precision farming that involves the use of nanoparticles with their unique properties to enhance plant health and crop productivity [1].

The goal of the present study is:

- Green synthesis of hematite nanoparticles using a seeds extract of *Cicer arietinum* L..
- Preparation of Fe₂O₃ loaded with a seed extract.
- Study of the phase and chemical composition as well as the structure of the synthesized nanoparticles and seeds of *Cicer arietinum* L..

SYNTHESIS

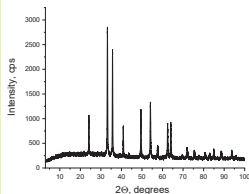
Fe₂O₃ nanoparticles were prepared by green synthesis using seeds extract of *Cicer arietinum* L., via Pluronic - assisted co-precipitation. Tri-block copolymer Pluronic P123 (Sigma-Aldrich, Mw = 5800), FeCl₃·6H₂O, urea and ammonia (Valerus Co., Sofia, Bulgaria) were used as initial precursors. The aqueous solution of Pluronic P123 (0.86 g P123 in 7.5 mL distilled water) was added to the 120 mL aqueous solution of 0.47M FeCl₃·6H₂O. Additionally the 3M urea (6 mL) was added. Then, the following were added to the mixture sequentially: 14 mL ammonia (25%) by drops until pH = 9 and finally an ethanol aqueous solution seeds extract of *Cicer arietinum* L. (9 mL). After precipitation, the suspension was stirred for about 1 h at room temperature. The obtained precipitates were filtered and washed with distilled water, dried up in an oven at 75 °C, and thereafter calcined at 500 °C for 2 hours and 30 minutes in air media. The other sample Fe₂O₃-NPs were prepared by same procedure without seeds extract. The prepared sample was loaded with 1 mL seeds extract. The obtained Fe₂O₃-NPs were designated N1 (green synthesized Fe₂O₃) and N2 (Fe₂O₃ nanoparticles loaded with a seed extract).



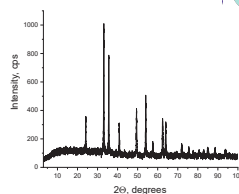
PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION

The phase composition and structure of the hematite nanoparticles were characterized by powder X-ray diffraction and Fourier-transform infrared spectroscopy. The seeds of *Cicer arietinum* L. were investigated by X-ray fluorescence spectroscopy and Fourier-transform infrared spectroscopy.

RESULTS



Powder XRD pattern of green synthesized Fe₂O₃ nanopowder (N1).



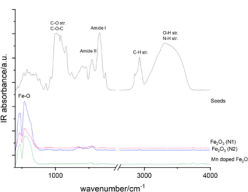
Powder XRD pattern of Fe₂O₃ nanopowder loaded with a seeds extract (N2).

Elemental composition (mass%) of seeds *Cicer arietinum* L. determined by XRF analysis.

Elements	Mg	Al	Si	P	S	Cl	K	Ca	Mn	Fe	Cu	Zn	Mg	Al
Result (mass%)	2,21	0,655	1,56	7,67	5,71	1,15	57,4	20,3	0,654	1,23	0,574	0,838	2,21	0,655

Calculated values of mean crystallite size (D), lattice strain (ε) and unit cell parameter (a) of Fe₂O₃ phases.

Sample	D, nm	ε, a.u	a, Å
Fe ₂ O ₃ (N1)	24	1,6x10 ⁻³	5.030
Fe ₂ O ₃ (N2)	22	1,7x10 ⁻³	5.028



FT-IR spectra of green synthesized Fe₂O₃ (N1), Fe₂O₃ nanoparticles loaded with a seeds extract (N2); Mn doped Fe₂O₃ (N1) and seeds powder of *Cicer arietinum* L..

CONCLUSION

- ❖ Fe₂O₃ nanoparticles are successfully green synthesized using a seeds extract of *Cicer arietinum* L..
- ❖ The prepared Fe₂O₃ materials are nanodimensional with a mean crystallite size of 22-24 nm.
- ❖ The XRF analysis established that green synthesized Fe₂O₃ were doped with 0.49 wt% Mn.

REFERENCES

1. A. Singh, N. B. Singh, I. Hussain, H. Singh, S.C. Singh, International Journal of Pharmaceutical Science Invention, 2015, 4 (8), 25-40.



Acknowledgements

This work has been carried out in the framework of the National Science Program "Critical and strategic raw materials for a green transition and sustainable development", approved by the Resolution of the Council of Ministers № 508/18.07.2024 and funded by the Ministry of Education and Science of Bulgaria (K.Z., R.T. and L.T.).

The work has received funding from the Horizon Europe research and innovation programme of the European Union under grant agreement No 101181400 (PROSPER) (M.G. and V.V.).

Нови антибактериални вещества, произведени от антарктически гъби

*Гочева Я., Дишлийска В., Стоянчева Г., Йовчевска Л., Абрашев Р.,
Митева-Сталева Ж., Гергинова М., Спасова Б.,
Ангелова М., Крумова Е.*

Институт по микробиология „Стефан Ангелов“, БАН

Микробната резистентност е едно от основните предизвикателства на съвременното. Поради тази причина научният интерес все повече се фокусира върху търсенето на нови вещества с уникални свойства, които да помогнат за преодоляването ѝ. Екстремните среди и микроорганизмите, които ги обитават, представляват обещаващ източник на такива съединения. Антарктическите филаментозни гъби, притежават уникални стратегии за оцеляване, които им позволяват да процъфтяват в неблагоприятни условия. Една от стратегиите им включва синтеза на нови метаболити, които подпомагат тяхната адаптация.

Това проучване има за цел да изследва потенциала на филаментозни гъби, изолирани от почвени проби, събрани на остров Ливингстън, Антарктида, да синтезират метаболити с антибактериална активност. Установено е, че седемдесет и пет процента от тестваните щамове произвеждат такива метаболити. Най-обещаващият сред тях е идентифициран като *Talaromyces pinophilus* П 13. Анализирани са метаболитният профил на антибактериалните съединения, произвеждани от този щам. Щамът произвежда β -лактамни антибиотици, както и други метаболити, проявяващи антимикробна активност, което разкрива значителния му потенциал за приложение.

Ключови думи: *филаментозни гъби, Антарктика, антибактериална активност*

Novel Antibacterial Substances Produced By Antarctic Fungi

*Gocheva Y., Dishliyska V., Stoyancheva G., Yovchevska L., Abrashev R.,
Miteva-Staleva J., Gerginova M., Spasova B., Angelova M., Krumova E.*
The Stephan Angeloff Institute of Microbiology

Microbial resistance is one of the major challenges of modern times. For this reason, scientific interest has increasingly focused on the search for new substances with unique properties to help overcome it. Extreme environments and the microorganisms that inhabit them represent a promising source of such compounds. Antarctic filamentous fungi, in particular, possess unique survival strategies that enable them to thrive in harsh conditions. One such strategy involves the synthesis of novel metabolites that support their adaptation.

This study aims to investigate the potential of filamentous fungi isolated from soil samples collected on Livingston Island, Antarctica, to synthesize metabolites with antibacterial activity. Seventy-five percent of the tested strains were found to produce such metabolites. The most promising among them was identified as *Talaromyces pinophilus* II 13. The metabolic profile of the antibacterial compounds produced by this strain was analyzed. The strain produces β -lactam antibiotics as well as other metabolites exhibiting antimicrobial activity which reveals its significant potential for application.

Acknowledgments: This study was funded by the Bulgarian Ministry of Education and Science through the National Centre for Polar Studies, and Sofia University “St. Kliment Ohridski” in the framework of the National Program for Polar Studies 2022–2025, project 70-25-99/23.06.2025 witch we would like to express our heartfelt thanks.

Key words: *filamentous fungi, Antarctica, antibacterial activity*

NOVEL ANTIBACTERIAL SUBSTANCES PRODUCED BY ANTARCTIC FUNGI

Gocheva, Y., Dishliyska, V., Stoyancheva, G., Yovchevska, L., Abrashev, R., Miteva-Staleva, J., Gerginova, M., Spasova, B., Angelova, M., Kumova, E.

The Stephan Angeloff Institute of Microbiology, Bulgarian Academy of Sciences, Acad. G. Bonchev str. bl.26, 1113 Sofia, Bulgaria, Corresponding author ekumova@abv.bg

Introduction - Microbial resistance is a major challenge nowadays, increasing the need for new bioactive compounds. Extreme environments and their microorganisms are promising sources of such substances. Antarctic filamentous fungi have unique survival strategies that include producing of novel adaptive metabolites. **The aim of this study is to investigate the potential of extremophilic filamentous fungi isolated from Antarctic soil samples collected on Livingston Island for the production of antibacterial compounds.**

Experimental workflow



Sample collection and fungal isolation



A total of 60 fungal strains were isolated, with mesophilic strains predominating.

Antibacterial activity

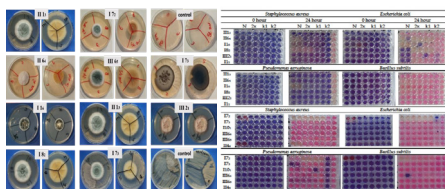


Fig. 1. Antibacterial activity of the selected active strains against E – *E.coli*, B- *B.subtilis*, S – *S. aureus*. A) Initial screening B) Rezaurin test

75% of the studied strains of Antarctic filamentous fungi produce substances with antimicrobial activity

This study was funded by the Bulgarian Ministry of Education and Science through the National Centre for Polar Studies, and Sofia University "St. Kliment Ohridski" in the framework of the National Program for Polar Studies 2022–2025, project 70-25-99/23.06.2025 which we would like to express our heartfelt thanks.

Metabolite analysis

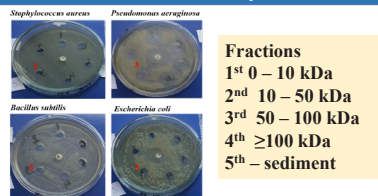


Fig.2. Fractional antibacterial activity culture fluid from *Talaromyces pinophilus*

Antibiotic detection

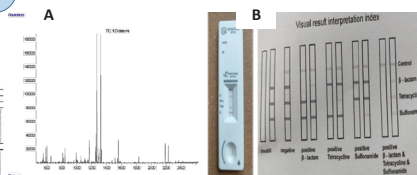


Fig. 3. A - Chromatogram of fraction 1
B - Quantum BT-S quick test

Indicated presence of β -lactam antibiotic

Conclusions

- *Talaromyces pinophilus* II13 was the most active strain, producing β -lactam antibiotics and other antimicrobial compounds.
- Extremophilic fungi represent a promising but underexplored resource for discovering new agents to combat antimicrobial resistance.

Изследване антифунгална активност на щамове *Lactobacillus* от ендометриален микробиом

Владислава Дишлийска, Людмила Йовчевска, Жени Митева-
Сталева, Екатерина Крумова, Галина Стоянчева
Институт по микробиология „Стефан Ангелов“, БАН

Научният интерес към микробиотата на ендометриума е все още относително нова област в сравнение с вагиналната и чревната микробиота. Проучвания на ендометриалната микробиота показват, че *Lactobacillus* spp. могат да присъстват и в ендометриума, особено при здрави или асимптоматични жени.

Множество *Lactobacillus* щамове демонстрират *in vitro* способност да инхибират растежа на дрожди и гъби като *Candida* spp. и други. Механизмите включват производство на млечна киселина, водороден пероксид и други микробни метаболити. Досегашните проучвания включват главно щамове *Lactobacillus*, изолирани от вагиналната микрофлора, а не от ендометриални проби.

В нашето проучване изследвахме 30 изолата *Lactobacillus* от ендометриални биопсии за антифунгална активност срещу *Candida albicans*. Изследвахме и способността им да продуцират вещества с радикал улавяща активност. Получените резултати допринасят за по-добро разбиране ролята на видовете *Lactobacillus* в ендометриалния микробиом.

Ключови думи: *Lactobacillus*, ендометриален микробиом, антифунгална активност

Study of antifungal activity of *Lactobacillus* strains from endometrial microbiome

*Vladislava Dishlijska, Ludmila Yovchevska, Jeny Miteva-Staleva,
Ekaterina Krumova, Galina Stoyancheva*
The Stephan Angeloff Institute of Microbiology

Scientific interest in the endometrial microbiota is still a relatively new area compared to the vaginal and intestinal microbiota. Studies on endometrial microbiota show that *Lactobacillus* spp. can yes are also present in the endometrium, especially at healthy or asymptomatic women.

Many *Lactobacillus* strains demonstrate in vitro ability yes inhibit growth on yeast and mushrooms as *Candida* spp. and others. The mechanisms include production on milky acid, hydrogen peroxide and others microbial metabolites. Previous studies have mainly involved *Lactobacillus* strains isolated from vaginal microflora, not from endometrial samples.

In our study, we tested 30 *Lactobacillus* isolates from endometrial biopsies for antifungal activity against *Candida albicans*. We also investigated their ability to produce substances with radical scavenging activity. The results obtained contribute to a better understanding of the role of *Lactobacillus* species in the endometrial microbiome.

Key words: *Lactobacillus*, endometrial microbiome, antifungal activity



STUDY OF ANTIFUNGAL ACTIVITY OF LACTOBACILLUS STRAINS FROM ENDOMETRIAL MICROBIOME



Vladislava Dishliyska¹, Lyudmila Yovchevska¹, Jany Miteva-Staleva¹, Ekaterina Krumova¹, Galina Stoyancheva^{2*}

¹ Department of Mycology, ² Department of General Microbiology, The Stephan Angeloff Institute of Microbiology, Bulgarian Academy of Sciences, Acad. G. Bonchev str. bl.26, 1113 Sofia, Bulgaria

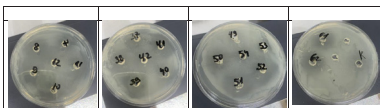
Introduction: Scientific interest in the endometrial microbiota is still a relatively new area compared to the vaginal and intestinal microbiota. Studies on endometrial microbiota show that *Lactobacillus* spp. present in the endometrium, especially in healthy or asymptomatic women.

Many *Lactobacillus* strains demonstrate in vitro ability to inhibit the growth of some yeast and filamentous fungi, such as *Candida* spp. and others. The mechanisms include the production of microbial metabolites such as milky acid, hydrogen peroxide, etc. Previous studies have mainly involved *Lactobacillus* strains isolated from vaginal microflora, not from endometrial samples.

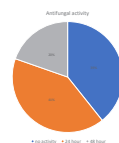
Aim: The aim of the present study is to investigate the potential of *Lactobacillus* isolates from endometrial biopsies for antifungal activity and their ability to produce substances with radical-scavenging activity.

Materials and methods The antifungal activity of 63 *Lactobacillus* spp isolates against *Candida albicans* (OD₅₀₀ = 0.317) was investigated. The experiment was carried out according to the well diffusion method on petri dishes with potato dextrose agar and the microdilution resazurin method in 96-well plates. The DPPH radical scavenging activity of 39 *Lactobacillus* spp. supernatants was determined.

Results Antifungal activity refers to the ability of strains or substances to inhibit fungal pathogen growth. A significant part of *Lactobacillus* isolates demonstrate an ability to produce substances with antifungal activity. Forty-one percent of the isolates showed antifungal activity against *Candida albicans* 24 hours after inoculation. After 48 hours of cultivation, 20 % of isolates inhibit fungal growth.

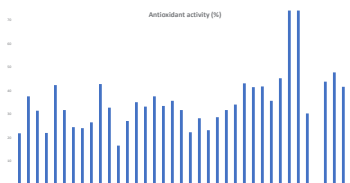
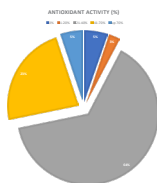


Isolate	24 hour	48 hour	72 hour	96 hour	120 hour	144 hour	168 hour
1	24	24	43	100	55		
2	24	24	43	100	55		
3	24	24	43	100	55		
4	24	24	43	100	55		
5	24	24	43	100	55		
6	24	24	43	100	55		
7	24	24	43	100	55		
8	24	24	43	100	55		
9	24	24	43	100	55		
10	24	24	43	100	55		
11	24	24	43	100	55		
12	24	24	43	100	55		
13	24	24	43	100	55		
14	24	24	43	100	55		
15	24	24	43	100	55		
16	24	24	43	100	55		
17	24	24	43	100	55		
18	24	24	43	100	55		
19	24	24	43	100	55		
20	24	24	43	100	55		
21	24	24	43	100	55		
22	24	24	43	100	55		
23	24	24	43	100	55		
24	24	24	43	100	55		
25	24	24	43	100	55		
26	24	24	43	100	55		
27	24	24	43	100	55		
28	24	24	43	100	55		
29	24	24	43	100	55		
30	24	24	43	100	55		
31	24	24	43	100	55		
32	24	24	43	100	55		
33	24	24	43	100	55		
34	24	24	43	100	55		
35	24	24	43	100	55		
36	24	24	43	100	55		
37	24	24	43	100	55		
38	24	24	43	100	55		
39	24	24	43	100	55		
40	24	24	43	100	55		
41	24	24	43	100	55		
42	24	24	43	100	55		
43	24	24	43	100	55		
44	24	24	43	100	55		
45	24	24	43	100	55		
46	24	24	43	100	55		
47	24	24	43	100	55		
48	24	24	43	100	55		
49	24	24	43	100	55		
50	24	24	43	100	55		
51	24	24	43	100	55		
52	24	24	43	100	55		
53	24	24	43	100	55		
54	24	24	43	100	55		
55	24	24	43	100	55		
56	24	24	43	100	55		
57	24	24	43	100	55		
58	24	24	43	100	55		
59	24	24	43	100	55		
60	24	24	43	100	55		
61	24	24	43	100	55		
62	24	24	43	100	55		
63	24	24	43	100	55		



After 24 hours of cultivation on petri dishes the average zone size was about 10-15 mm.

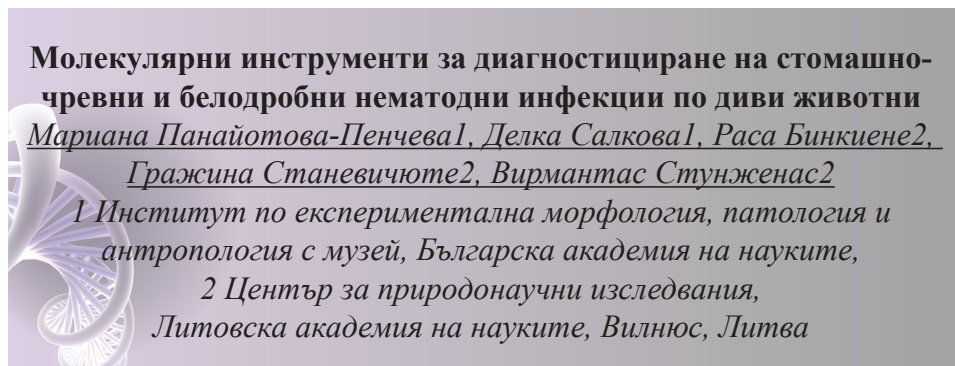
Radical scavenging activity of the isolates was investigated. About 5% of the investigated *Lactobacillus* strains don't have antioxidant activity. The highest ability to scavenge DPPH radical showed 5 % of isolates.



Conclusion *Lactobacillus* isolates from endometrial biopsies possess high antifungal activity against *Candida albicans*. They demonstrate the ability to produce substances with radical scavenging activity. The obtained results contribute to a better understanding of the role of *Lactobacillus* species in the endometrial microbiome.

Acknowledgements: This research was funded by the Scientific Research Fund at the Ministry of Education and Science, Bulgaria, grant number K11-06-H83/6, to whom we express our acknowledgements.

*Correspondence author: Galina Stoyancheva, e-mail: galinadinkova@abv.bg



Молекулярни инструменти за диагностициране на стомашно-чревни и белодробни нематодни инфекции по диви животни

Мариана Панайотова-Пенчева¹, Делка Салкова¹, Раса Бинкиене²,

Гражина Станевичюте², Вирмантас Стунженас²

¹ Институт по експериментална морфология, патология и антропология с музей, Българска академия на науките,

² Център за природонаучни изследвания,

Литовска академия на науките, Вилнюс, Литва

Предистория: Паразитните нематоди влияят значително върху здравето и опазването на популациите на дивите животни. Традиционната морфологична идентификация на ларвите и яйцата често не е достатъчно добра за разграничаване на близкородствени видове. Поради това молекулярните диагностични техники са станали от съществено значение за точното идентифициране на патогените и епидемиологичното наблюдение. Цели: Това проучване представя кратък преглед на съвременните молекулярни методологии, използвани за откриване и характеризиране на стомашно-чревни и белодробни нематоди при различни диви животни. Методология: Представени са данни в сравнителен аспект от научни разработки по темата. Прегледът се фокусира върху ключови параметри, като видове паразити и жизнени етапи, диапазон на гостоприемниците, протоколи за екстракция на ДНК и целеви геномни региони. Обръща се внимание и на избора на праймери и получените размери на ампликоните, използвани в диагностичните анализи. Резултати: Анализът на събраните данни подчертава основната зависимост от рибозомни ДНК маркери (като ITS1 и ITS2) и митохондриални гени (напр. COI) за идентификация на нематоди на видово ниво. Обобщени са различни PCR-базирани подходи и техники за екстракция, оптимизирани както за неинвазивни фекални проби, така и за проби от белодробна тъкан, които са от съществено значение за цялостен мониторинг на здравето на дивите животни. Заключение: Този преглед подчертава значението на стандартизираните молекулярни инструменти за подобряване на разбирането ни за разнообразието на нематодите и динамиката на разпространение в дивата природа. Систематизираните данни могат да послужат като практическо ръководство за изследователите и

да улеснят избора на подходящи генетични маркери и праймери за изследвания в областта на паразитологията на дивите животни. Благодарности: Изследването е с финансова подкрепа от Българската академия на науките (Двустранно споразумение между БАН и ЛАН, № IC-LT/01/2025-2027). Проект: „Интегративен таксономичен подход за изучаване на етиологията на хелминтозите при дивите животни в България и Литва.

Ключови думи: *болести по дивите животни, молекулярна диагностика, стомашно-чревни нематоди, белодробни червеи, PCR праймери*

Molecular tools for diagnosing gastrointestinal and lung nematode infections in wildlife

*Mariana Panayotova-Pencheva¹, Delka Salkova¹, Rasa Binkienė²,
Gražina Stanevičiūtė², Virmantas Stunžėnas²*

*¹ Institute of Experimental Morphology, Pathology and Anthropology
with Museum, Bulgarian Academy of Sciences,*

*² Lithuanian Academy of Sciences, Nature Research Centre,
Vilnius, Lithuania*

Background: Parasitic nematodes significantly affect the health and conservation of wildlife populations. Traditional morphological identification of larvae and eggs often lacks the resolution needed to distinguish closely related species. To address this, molecular diagnostic techniques have become essential for accurate pathogen identification and epidemiological surveillance. Objectives: This study presents a brief review of current molecular methodologies used to detect and characterize gastrointestinal and lung nematodes in various wildlife hosts. Methodology: Data from recent scientific developments were systematically compared. The review focuses on key parameters, including parasite species and life stages, host range, DNA extraction protocols, and target genomic regions. Attention is also given to primer selection and resulting amplicon sizes used in diagnostic assays. Results: Analysis of the compiled data highlights a primary reliance on ribosomal DNA markers (such as ITS1 and ITS2) and mitochondrial genes (e.g., COI) for species-level identification of nematodes. Various PCR-based approaches and extraction techniques

optimized for both non-invasive fecal samples and post-mortem lung tissue specimens are summarized, which are essential for comprehensive wildlife health monitoring. Conclusion: This review emphasizes the importance of standardized molecular tools in improving our understanding of nematode diversity and transmission dynamics in the wild. The systematized data can serve as a practical guide for researchers and facilitate the selection of appropriate genetic markers and primers for wildlife parasitology research. Acknowledgements: The financial support from the Bulgarian Academy of Sciences (Bilateral agreement between BAS and LAS, № IC-LT/01/2025-2027) is gratefully acknowledged. Project: “An integrative taxonomic approach to studying etiology of helminthoses in wild animals in Bulgaria and Lithuania.

Key words: *wildlife diseases, molecular diagnostics, gastrointestinal nematodes, lungworms, PCR primers*

Ефект на прайминга на семена с UV-C върху растежните параметри и количеството осмолити в микрорастения кейл

Елена Шопова, Лиляна Бранкова, Людмила Димитрова, Зорница Катерова, Десислава Тодорова

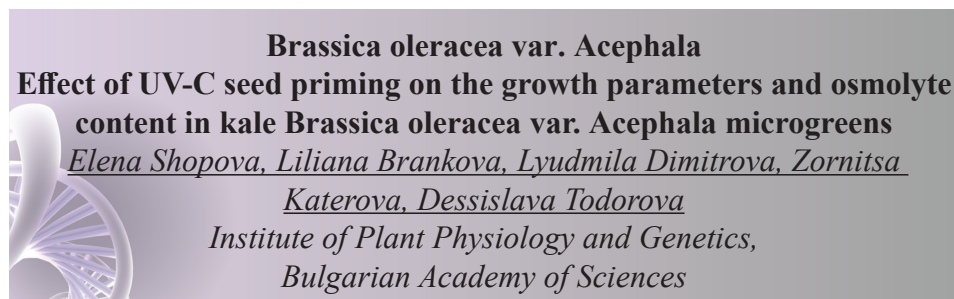
*Институт по физиология на растенията и генетика,
Българска академия на науките*

Кейлът (*Brassica oleracea* var. *acephala*) е функционална храна, богата на ценни биологично активни вещества (глюкозинолати, феноли и каротеноиди) с изразени антиоксидантни, противовъзпалителни и антитуморни свойства. В настоящето изследване се анализират възможностите за модулиране на фитохимичния състав на десетдневни микрорастения кейл от различни сортове, посредством прайминг на семената с UV-C светлина. Изследвани са техните основни биометрични показатели и количеството на осмолитите (редуциращи захари, свободен пролин и общи осмолити). Използвани са два сорта кейл - Nero di Toscana и Red Scarlet. Семената са предварително третираны с UV-C за 20, 40, 60, 80 и 100 минути. Праймингът на семената с UV-C води до повишаване на стойностите на растежните показатели при

двата сорта кейл и повлиява количеството на измерените осмолити.

Благодарности: Изследването е финансирано от Фонд научни изследвания към МОН (грант КП-06-Н96/5 09.12.2025)./

Ключови думи: микрорастения, кейл, осмолити, UV-C



Kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) is a functional food rich in valuable biologically active compounds (glucosinolates, phenolics, and carotenoids) with pronounced antioxidant, anti-inflammatory, and antitumor properties. The present study analyzes the possibilities for modulating the phytochemical composition of ten-day-old kale microgreens from different cultivars through seed priming with UV-C light. Their main biometric parameters and the content of osmolytes (reducing sugars, free proline, and total osmolytes) were investigated. Two kale cultivars were used: Nero di Toscana and Red Scarlet. The seeds were pretreated with UV-C for 20, 40, 60, 80, and 100 minutes. Seed priming with UV-C resulted in increased values of growth parameters in both kale cultivars and influenced the amount of the measured osmolytes.

Acknowledgments. This study was funded by National Science Fund, Ministry of Education and Science (grant KP-06-N96/5 9.12.25).

Key words: microgreens, kale, osmolytes, UV elicitor

Промени в съдържанието на полиамини в българска пшеница сорт Фермер, предизвикани от засушаване и мелатонин

Десислава Тодорова, Цветина Николова, Зорница Катерова,

Мартин Илиев, Людмила Димитрова, Искрен Сергиев

Институт по физиология на растенията и генетика,

Българска академия на науките

Полиамините и мелатонинът са важни регулатори на растежа и развитието на растенията. Известно е също, че те играят съществена роля във физиологичните реакции към различни стресови фактори. Засушаването е един от широко разпространените абиотични стресове, които нарушават важни физиологични процеси в растенията. Седемнадесетдневни прорастъци от българска пшеница (*Triticum aestivum* L.) сорт Фермер са отглеждани като почвена култура при контролирани условия и са подложени на засушаване чрез прекратяване на поливането в продължение на пет дни. Воден разтвор на мелатонин е приложен 24 часа преди засушаването или в началото на периода на възстановяване върху част от контролните и стресираните растения. Концентрациите на полиамините путресцин, спермидин и спермин са измерени в супернатантата като свободна и конюгирана фракция, както и в утайката след киселинна екстракция от листни проби веднага след стреса и след 4 дни възстановяване. Концентрациите на полиамини се увеличават съществено след засушаването, но намаляват по време на възстановяването. Самостоятелното третиране с мелатонин повишава в значително по-голяма степен нивата им, особено на тези от конюгираната фракция, докато комбинираното приложение със засушаване намалява този ефект. Резултатът от третирането с мелатонин върху полиаминовия пул е по-силен, когато е приложен преди засушаване. Данните показват, че мелатонинът регулира ендогенните полиамини в пшеницата, което е от полза за физиологичното състояние на растенията в условия на засушаване. Благодарности: Това изследване е финансирано от Фонд „Научни изследвания“ на България (договор КП-06-Н66/7 от 13 декември 2022 г.).

Ключови думи: *спермин, спермидин, путресцин, засушаване, мелатонин, Triticum aestivum L.*

Alterations in the polyamine content of the Bulgarian wheat cultivar Fermer induced by drought and melatonin

Dessislava Todorova, Tsvetina Nikolova, Zornitsa Katerova,

Martin Iliev, Ludmila Dimitrova, Iskren Sergiev

Institute of Plant Physiology and Genetics,

Bulgarian Academy of Sciences

Polyamines and melatonin are important regulators of plant growth and development. They are also acknowledged to play different roles in physiological responses to variety of stress factors. Drought is one of the widely distributed abiotic stress that interrupt key physiological processes in plants. Seventeen-day-old seedlings of the Bulgarian wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivar Fermer were grown as a soil culture under controlled conditions and were subjected to drought by withholding watering for five days. Water solution of melatonin was applied 24h before drought or in the beginning of the recovery period on part of the control and stressed plants. The concentrations of polyamines putrescine, spermidine and spermine were measured in free, supernatant-conjugated and pellet-bound fractions of acid extracts of leaf samples immediately after stress and following 4 days of recovery. Polyamine concentrations increased considerably after drought, but declined during the recovery. Melatonin treatment alone raised in a large extent their levels, especially that of supernatant-conjugated fraction, while the combined application with drought diminished this effect. The outcome of melatonin treatment on polyamine pool was stronger when it was supplied before drought. The data suggest that melatonin regulates the endogenous polyamines in wheat, which benefits the plant physiological performance under drought stress conditions.

Acknowledgment: This investigation was financed by the Bulgarian National Science Fund (grant KP-06-N66/7, 13 December 2022).

Key words: *spermine, spermidine, putrescine, drought, melatonin, Triticum aestivum L.*

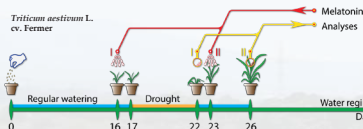


ALTERATIONS IN THE POLYAMINE CONTENT OF THE BULGARIAN WHEAT CULTIVAR FERMER INDUCED BY DROUGHT AND MELATONIN



Desislava Todorova, Tsvetina Nikolova, Zornitsa Katerova, Martin Iliev, Ludmila Dimitrova, Iskren Sergiev
Institute of Plant Physiology and Genetics – Bulgarian Academy of Science, Acad. G. Bonchev str., bl. 21, 1113, Sofia, Bulgaria

Polyamines and melatonin are among the key regulators of plant growth and development. Both of them participate in physiological response of various stress factors including drought – one of the most common and disruptive environmental variable. The study aims to examine the melatonin potential to modulate polyamine pool after drought.



MATERIAL AND METHODS

Seeds: Bulgarian winter wheat (*Triticum aestivum* L.) cv. Fermer, obtained from the Institute of Plant Genetic Resources (Sadovo).

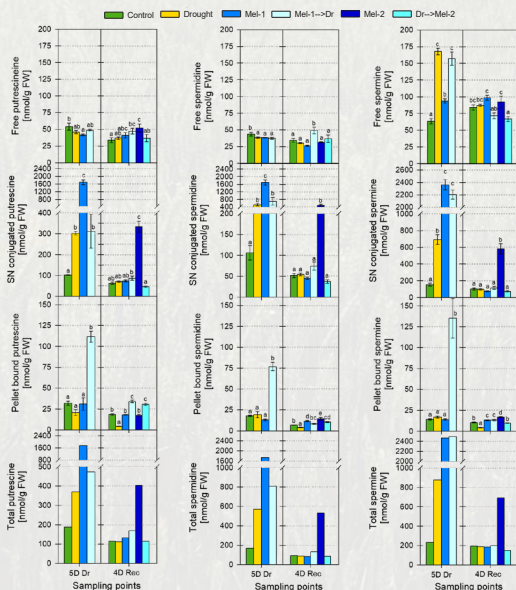
Growth conditions: Soil culture, in growth chamber (14/10 h photoperiod, 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, 21/19 °C day/night temperatures, 60% air humidity).

Drought: Five days period achieved by withholding water at BBCH stage 12 (17 day old plants).

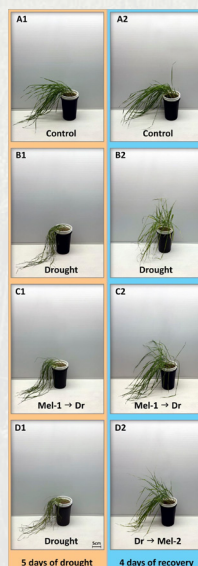
Melatonin (Mel) application: Plants received root treatment of 10ml 75 μM aqueous melatonin solution 24h before (Mel-1→Dr) or after (Dr→Mel-2) the stress period.

Sampling points: At the fifth day of drought (5D Dr) and four days after resuming/renew the watering (4D Rec).

Assays: The concentration of free polyamines putrescine (Put), spermidine (Spd) and spermine (Spm) are determined via the direct dansylation method of Smith and Best (1977). To assess supernatant (SN) conjugated and pellet bound polyamines the method of Torrigiani et al. (1989) was used. To separate different fractions of Put, Spd and Spm a TLC (Silicagel G 60 plates) was performed (solvent system of cyclohexane:ethylacetate), the spots marked under UV light, scraped off and eluted in anhydrous acetone and fluorescence was measured (excitation 360 nm, emission 505.5 nm).



Content of putrescine, spermidine and spermine fractions in the leaves of wheat cv. Fermer.



Phenotype alterations in wheat cv. Fermer.

RESULTS

Drought increased all of the total polyamines measured (Put, Spd and Spm), due to their SN conjugated fraction (5D Dr), as well as free Spm, but during the recovery only a significant decrease in pellet bound fractions was found.

Melatonin pre-treatment alone induced total polyamine content higher than the drought stress due to the SN conjugated fraction (5D Dr), however pellet bound Put and Spm were slightly raised at recovery.

Combined melatonin application before drought increased total polyamines (Spm>Spd>Put) predominantly at the fifth day of drought, due to serious induction in SN conjugated and pellet bound fractions, which were enhanced significantly more than the drought only.

Melatonin post-treatment alone raised total polyamine concentrations, in particular SN-conjugated fractions. Probably due to the time shift with pre-treatment alone on 5D Dr, the induction is not so high.

Combined melatonin application after drought increased slightly pellet bound fractions of polyamines, which was significantly more than the drought stress only.

CONCLUSION

Melatonin treatment applied before drought had stronger effect than when it was applied after the stress. The observed regulation on endogenous polyamines by melatonin probably have beneficial effect on the physiological performance of the Bulgarian wheat cv. Fermer grown under mild drought conditions.



Acknowledgment: The investigation was financed by the Bulgarian National Science Fund (grant KP-06-N66/7; 13-12-2022).



Модулиращ ефект от кореново прилагане на мелатонин преди и след засушаване върху нивата на полиамини в млади пшенични растения

Зорница Катерова, Десислава Тодорова, Людмила Димитрова,
Мартин Илиев, Цветина Николова, Искрен Сергиев
Институт по физиология на растенията и генетика,
Българска академия на науките

Полиамините са регулатори с ключова роля в растежа и развитието на растенията и физиологичните реакции към стресови фактори. Сушата е фактор на околната среда, който влияе върху нормалния растеж и развитие на растенията. Мелатонинът (N-ацетил-5-метокситриптамин) е метаболит със свойство да обеврежда реактивни форми на кислорода и се счита за основен регулатор, подобряващ физиологичния отговор на растенията към стрес. Пшенични растения (*Triticum aestivum* L.) от българския сорт Гинес (селекциониран като относително устойчив на засушаване) са отглеждани при контролирани условия и подложени на почвено засушаване в продължение на 5 дни. Част от контролните и засушените растения бяха подхранени с 10 ml 75 μ M мелатонин, приложен 24 часа преди или след стресовия период. Съдържанието на свободни, конюгирани в супернатантата и свързани в утайката фракции на полиамини, а именно путресцин, спермидин и спермин, беше определено на 5-ия ден от началото на засушаването и 4 дни след възстановяване. Концентрациите на полиамините бяха леко увеличени в следствие на засушаването, но след възстановяване на поливането показаха тенденции на намаление. Приложен самостоятелно мелатонинът значително увеличава съдържанието на полиамини, а в комбинация със засушаване беше регистрирано натрупване на допълнителни количества. Получените резултати показват комплексно взаимодействие между мелатонина и полиамините за намаляване на негативните последици от засушаването при относително толерантния български сорт Гинес.

Благодарности: Това проучване е финансирано от Фонд „Научни изследвания“, договор КП-06-Н66/7 от 13 декември 2022 г.

Ключови думи: *спермин, спермидин, путресцин, засушаване, мелатонин, Triticum aestivum L.*

Modulatory effects of pre- and post-drought root application of melatonin on the polyamine levels in young wheat plants

Zornitsa Katerova, Dessislava Todorova, Lyudmila Dimitrova, Martin

Iliev, Tsvetina Nikolova, Iskren Sergiev

*Institute of Plant Physiology and Genetics,
Bulgarian Academy of Sciences*

Polyamines are plant growth regulators with key role in plant growth and development and physiological responses to stress factors. Drought is an environmental factor that affect normal plant growth and development. Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) is a natural metabolite with properties of reactive oxygen species scavenger and considered as a master plant regulator improving physiological response toward stress. Wheat (*Triticum aestivum* L.) plants of the Bulgarian variety Gines (selected as relatively drought tolerant) were grown under controlled conditions and subjected to soil drought for 5 days. Part of the control and droughted plants were root-supplemented with 10 ml of 75 μ M melatonin applied 24h before or after the stress period. The content of free, supernatant-conjugated and pellet-bound fractions of polyamines vis. putrescine, spermidine and spermine was determined at the 5th day of drought and 4 days after drought during the recovery. Polyamine concentrations increased slightly after drought, but tendency of decrease was found after restoring the normal irrigation. Melatonin enhanced notably the polyamine pool, and in combination with drought, an additional accumulation of the polyamines was recorded. The obtained results suggest a complex interplay between melatonin and the polyamine pool in alleviating the negative consequences of drought in the relatively tolerant Bulgarian wheat cultivar Gines.

Acknowledgment: This study was financed by the Bulgarian National Science Fund, grant KP-06-N66/7, 13 December 2022.

Key words: *spermine, spermidine, putrescine, drought, melatonin, Triticum aestivum L.*

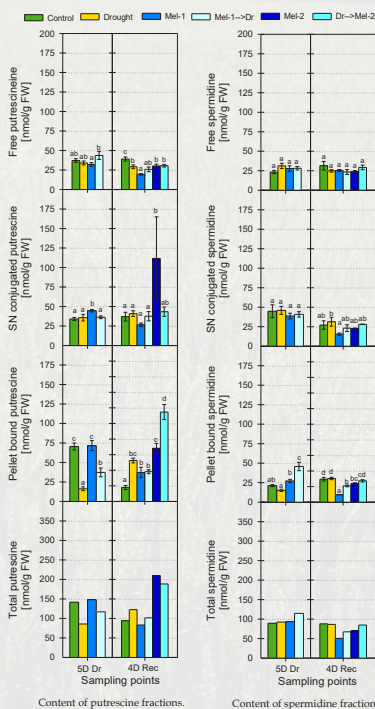
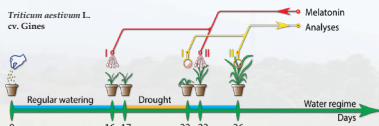


MODULATORY EFFECTS OF PRE- AND POST-DROUGHT ROOT APPLICATION OF MELATONIN ON THE POLYAMINE LEVELS IN YOUNG WHEAT PLANTS



Zornitsa Katerova, Dessislava Todorova, Lyudmila Dimitrova, Martin Iliev, Tsvetina Nikolova, Iskren Sergiev
Institute of Plant Physiology and Genetics – Bulgarian Academy of Science, Acad. G. Bonchev str., bl. 21, 1113, Sofia, Bulgaria

Polyamines and melatonin are among the plant growth regulators with chief role in growth, ontogenesis and physiological response of plants to stress variables. Wheat is an important crop and drought is an environmental factor of high negative impact on plants. The investigation aims to study the melatonin potential to modulate polyamine fractions after water shortage in the Bulgarian wheat variety Gines, selected as relatively drought tolerant.



RESULTS

Drought increased free and pellet-bound Spm, but decreased pellet-bound Put and SN conjugated Spm (5D Dr), however during the recovery an induction of pellet-bound fractions led to relative compensation of total polyamine levels. Melatonin pre-treatment alone induced slightly total polyamine content but kept it closer to the control than drought stress (SD Dr), however at the final measurement point a slight decrease due to pellet-bound and SN conjugated fractions was detected.

Combined melatonin application before drought increased total polyamines (Spm>Spd) at the fifth day of drought, but at recovery neared the control values. Melatonin post-treatment alone raised total Put concentration, in particular SN conjugated and pellet-bound fractions, however a slight reduction was measured in pellet-bound levels of higher polyamines.

Combined melatonin application after drought increased total Put and total Spm levels due to induction of the corresponding pellet-bound and SN conjugated fraction, respectively.

CONCLUSION

The obtained results could suggest a complex interplay among the exogenous melatonin application and the polyamine pool mitigating the adverse effects in the relatively tolerant Bulgarian wheat cultivar Gines grown under mild drought environment.

MATERIAL AND METHODS

Seeds: Bulgarian wheat (*Triticum aestivum* L.) cv. Gines was achieved from the Institute of Plant Genetic Resources, Sadovo.

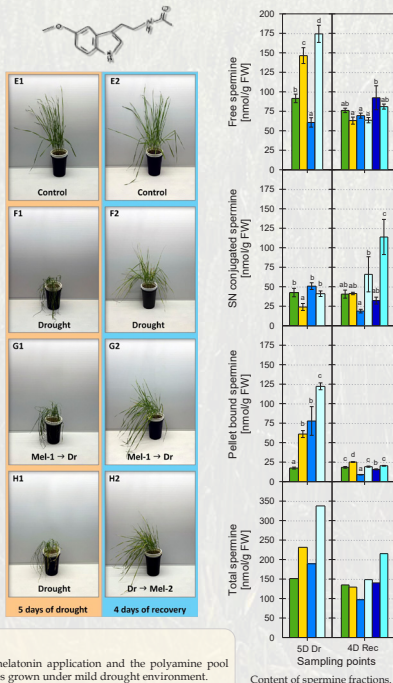
Growth conditions: Soil culture, growth chamber maintained at 14/10 h day/night, 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ photosynthetically active radiation, 21/19 °C temperatures, 60% air humidity.

Drought (Dr): At BBCH stage 12 (17 day old plants), five days stress period was obtained by withholding water.

Melatonin (Mel) supplementation: Root application of 10ml 75 μM Mel aqueous solution 24h before (Mel-1 $\rightarrow$ Dr) or after (Dr $\rightarrow$ Mel-2) drought.

Sampling: The above-ground part of wheat plants was collected at the fifth day of drought (5D Dr) and four days after recovery (4D Rec).

Polyamine detection: To determine the free polyamine concentrations of putrescine (Put), spermidine (Spd) and spermine (Spm) direct dansylation method of Smith and Best (1977) was used. The supernatant (SN) conjugated and pellet bound fractions were assessed by the method of Torrigiani et al. (1989). A TLC (Silicagel G 60 plates) was used to separate the fractions of Put, Spd and Spm via solvent system of cyclohexane:ethylacetate, the spots pointed under UV light were scraped off, then eluted in anhydrous acetone and the fluorescence was detected (excitation 360 nm, emission 505.5 nm).



Acknowledgment: The investigation was financed by the Bulgarian National Science Fund (grant KP-06-N66/7; 13-12-2022).



Ферментационни продукти на България - традиция и нови технологии за функционални продукти

Радослав Абрашев¹, Лили Добрева¹, Nicoleta Атанасова¹,
Екатерина Крумова¹, Петър Дончев¹, Грета Найденова², Апостол
Апостолов², Драгомир Янков², Светла Данова¹

¹ Институт по микробиология „Стефан Ангелов“, Българска академия на науките,

² Институт по инженерна химия, Българска академия на науките

Традиционните ферментационни храни заемат важно място в културното наследство и хранителните практики на различни народи. Те са доказан източник и на пробиотични млечно кисели бактерии (МКБ). В условията на динамични промени в потребителското търсене се наблюдава нарастващ интерес към продукти, които съчетават традиционни технологии на производство с доказани здравословни ползи. В тази връзка са разработките на колектив от Институт по микробиология и Институт по инженерна химия БАН с финансовата подкрепа на New Generation EU по ПВУ. Търсят се микробни щамове, които допринасят за подобряване на хранителната стойност, безопасността и органолептичните характеристики на храните. Целта е с помощта на иновативни решения за ферментационни процеси, зелени технологии с включването на вторични продукти от агро и био производства, да бъдат произведени Биотици. Про/ постбиотиците, с научно доказани ползи успешно могат да се включат в хранителни добавки за влагане във функционални продукти за здраве. Оценени са оригинални български щамове лактобацили, изолирани от традиционните български продукти-кисело мляко, сирене, катък, туршии и кисело зеле, като естествени антагонисти на развалящи храните и болестотворните микроорганизми. С помощта на молекулярни и метаболомни анализи е доказан потенциала им като кандидат- фармабиотици. Охарактеризирани са механизми за ефективно участие на пробиотиците в анти-оксидантната защита на организма. Разработени са варианти на икономически рентабилни и екологични технологии за производство на широк спектър от метабиотици, от избрани активни щамове лактобацили. Внедряването им ще създаде възможности да се отговори на търсенето на натурални,

функционални и минимално преработени продукти и биотици с научно доказани качества.

Благодарности: Авторите изказват благодарност за финансовата подкрепа по проект № PVU-63 от 16.12.2024 г. BG-RRP-2.017-0047-C01 „Нови подходи за избор и интегриране на БИОТИЦИ (про/ пост и метабиотици) във функционални формули за хранителни добавки с висок биологичен потенциал на базата на агро и промишлени отпадъци“, по Механизма за възстановяване и устойчивост за изпълнение на инвестиция C2I2.

Ключови думи: *lactobacilli, пробиотици, постбиотици, функционални храни, механизъм на действие*

Fermentation products of Bulgaria - tradition and new technologies for functional products

Radoslav Abrashev¹, Lili Dobрева¹, Nikoleta Atanasova¹, Ekaterina Krumova¹, Petar Donchev¹, Greta Naydenova², Apostol Apostolov²,

Dragomir Yankov², Svetla Danova¹

¹ Stephan Angeloff Institute of Microbiology,

Bulgarian Academy of Sciences

² Institute of Chemical Engineering, Bulgarian Academy of Sciences

Traditional fermented foods take an important place in the cultural heritage and dietary practices of many nations. They are also a proven source of probiotics. In the context of dynamic changes in consumer demand, a growing interest is observed in products that combine traditional production technologies with scientifically proven health benefits.

In this regard, research has been carried out by a team from the Institute of Microbiology and the Institute of Chemical Engineering of the BAS. The research focuses on identifying microbial strains that contribute to improving the nutritional value, safety, and organoleptic characteristics of foods. The aim is to produce biotics through innovative solutions for fermentation processes and green technologies, including the use of by-products from agro/industrial production. Probiotics and postbiotics with benefits can be successfully incorporated into dietary supplements and products intended to support human health.

Original Bulgarian lactobacilli isolated from traditional products –

yogurt, cheese, katak, pickled vegetables, and fermented cabbage – have been evaluated as natural antagonists of food-spoilage and pathogenic microorganisms. Through molecular and metabolomic analyses, their potential as candidate pharmabiotics has been demonstrated. Mechanisms responsible for the effective participation of probiotics in the antioxidant defense of the human body have also been characterized.

Economically viable and environmentally friendly technological approaches have been developed for the production of a broad spectrum of metabiotics from selected active Lactobacilli. Their implementation will create opportunities to meet the growing demand for natural, functional, and minimally processed products, as well as for Biotics with scientifically proven health-promoting properties.

Acknowledgment: The authors acknowledge the financial support of the project No. PVU-63 of 16.12.2024 BG-RRP-2.017-0047-C01 “New approaches for selection and integration of BIOTICS (pro/post and metabiotics) in functional formulas for food supplements with high biological potential based on agro and industrial waste”, under the Recovery and Sustainability Mechanism for the implementation of investment C2I2.

Key words: *lactobacilli, probiotics, postbiotics, functional foods, bio waste*



Fermentation Products of Bulgaria - Tradition and New Technologies for Functional Products

Radoslav Abrashev¹, Lili Dobрева¹, Nikolaeta Atanasova¹, Ekaterina Krumova¹, Petar Donchev¹, Greta Naydenova², Apostol Apostolov², Dragomir Yankov², Maria Angelova¹, Svetla Danova^{1*}
¹ Stephan Angeloff Institute of Microbiology, BAS; 26, Acad. G. Bontchev Str. 1113 Sofia, Bulgaria;
² Institute of Chemical Engineering, BAS; 21 Acad. G. Bontchev Str. Sofia, Bulgaria

Traditional fermented foods take an important place in the cultural heritage and dietary practices of many nations. They are also a proven source of probiotics. In the context of dynamic changes in consumer demand, a growing interest is observed in products that combine traditional production technologies with scientifically proven health benefits.

Bulgaria is famous with its centuries of tradition in the production and consumption of a high variety of fermented products, with long history of safety use, proven functionality and nutritive value



IN THIS REGARD, RESEARCH HAS BEEN CARRIED OUT BY A TEAM FROM

Stephan Angeloff Institute of Microbiology, BAS

Institute of Chemical Engineering, BAS



The research focuses on identifying microbial strains that contribute to improving the nutritional value, safety, and organoleptic characteristics of foods.

THE AIM is to produce biotics through innovative solutions for fermentation processes and green technologies, including the use of by-products from agro/industrial production. Probiotics and postbiotics with benefits can be successfully incorporated into dietary supplements and products intended to support human health.



NEW BIOTICS:
PROBIOTICS, POSTBIOTICS,
PARABIOTICS, SINBIOTICS



BIODIVERSITY and ACTIVITY of LAB microbiota:
 > Traditional fermented dairy and non-dairy food
 > Human samples and plants

Conserving biodiversity through traditional practices

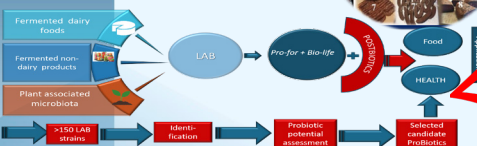
FUNCTIONAL, NATURALLY PRESERVED AND SAFETY FOOD



Original Bulgarian lactobacilli isolated from traditional products - yogurt, cheese, katak, pickled vegetables, and fermented cabbage - have been evaluated as natural antagonists of food-spoilage and pathogenic microorganisms



Through molecular and metabolomic analyses, their potential as candidate pharmabiotics has been demonstrated. Mechanisms responsible for the effective participation of probiotics in the antioxidant defense of the human body have also been characterized.



Economically viable and environmentally friendly technological approaches have been developed for the production of a broad spectrum of metabiotics from selected active *Lactobacilli*.

THEIR IMPLEMENTATION WILL CREATE OPPORTUNITIES TO MEET THE GROWING DEMAND FOR NATURAL, FUNCTIONAL, AND MINIMALLY PROCESSED PRODUCTS, AS WELL AS FOR BIOTICS WITH SCIENTIFICALLY PROVEN HEALTH-PROMOTING PROPERTIES.

The authors acknowledge the financial support of the project No. PVU-63 of 16.12.2024 BG-RRP-2.017-0047. C01 "New approaches for selection and integration of BIOTICS (pro/post and metabiotics) in functional formulas

Проверка на способността на симулационната програма ANSYS Fluent да прогнозира времето на фазов преход при охлаждане на PCM тип парафин

Константина Вл. Стефанова, Надежда Др. Шукова

Институт по инженерна химия - Българска академия на науките

За целите на проекта с тема „Изследвания за интегриране на топлинен регулатор в земната маса над хоризонтално разположени земнобазирани топлообменници на геотермалните инсталации, посредством фазопреобразуващи компоненти като възобновяем източник на топлинна енергия в земната маса с методите на CFD“ са провели симулации с програмата ANSYS с работният пакет Fluent, включващи топлобмен и/или фазов преход за резервоар с парафин PCM Rubitherm RT–21. Парафинът е избран, така, че да удовлетворява експериментално получени данни при естественото слънцезареждане на изследван земен пласт между 2м и 6 м. Получените симулационни резултати са сравнени с експерименталните данни за проверка на времето за охлаждане и потенциала на резервоара като източника на енергия, заместващ локалното зареждане.

Очаква се така предложеният топлинен регулатор/ акумулатор/ PCM да е като допълнителен елемент в хоризонтални геотермалните инсталации, подходящ за компенсиране на частичните топлинни загуби с течение на времето в земната маса или да осигурява частична независимост от необходимостта от директно слънцегреење на терена над земнобазиращия хоризонтално разположен топлообменник. Добавянето на топлинен регулатор/ акумулатор/ PCM ще позволи използването на терена за отглеждане на селскостопанска продукция, или ще позволи наличието на дървета в участъка, или ще е подходящ терен за паркиране.

Благодарности: Настоящото изследване е реализирано с финансовата подкрепа на Фонд „Научни изследвания“ (ФНИ) към Министерството на образованието и науката на Република България, договор № КП-06-M97/5, 10.12.2025 г.

Ключови думи: хоризонтални земнобазирани топлообменници, съхранение на топлина, фазопреобразуващи материали, възобновяеми енергийни източници



Verification of the ability of the ANSYS Fluent simulation program to predict the phase transition time during the cooling of paraffin-type PCM

Konstantina Vl. Stefanova, Nadezhda Dr. Shukova

Institute of Chemical Engineering, Bulgarian Academy of Sciences

For the project with the topic “Research on integrating a thermal regulator into the ground mass above horizontally located ground-based heat exchangers of geothermal installations, using phase-change material (PCM) as a renewable source of heat energy in the ground mass by CFD methods” simulations were conducted with the ANSYS program using the Fluent work package, including heat exchange and/or phase transition for a tank with paraffin PCM Rubitherm RT – 21. The paraffin was chosen to satisfy experimentally obtained data during the natural solar charging of a studied earth layer between 2 m and 6 m.

The obtained simulation results were compared with experimental data to verify the cooling time and the potential of the reservoir as the energy source replacing local charging.

It is expected that the proposed thermal regulator/accumulator/PCM will be an additional element in horizontal geothermal installations, suitable for compensating for partial heat losses over time in the ground mass or for providing partial independence from the need for direct solar heating of the terrain above the ground-based horizontally located heat exchanger. The addition of a thermal regulator/accumulator/PCM will allow the use of the terrain for growing agricultural products or will allow the presence of trees in the area, or will be a suitable terrain for parking.

Acknowledgment: This work is supported by Bulgarian National Science Fund Contract № KII-06-M97/5, 10.12.2025.

Key words: *horizontal ground heat exchanger (GHE), thermal energy storage (TES), phases change material (PCM), renewable energy sources (RES)*

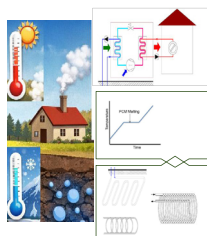
Verification of the ability of the ANSYS Fluent simulation program to predict the phase transition time during the cooling of paraffin-type PCM

Konstantina Vl. Stefanova*, Nadezhda Dr. Shukova
email: k.stefanova@iche.bas.bg, ktambolieva@abv.bg

Introduction

The use of paraffin as a phase change material (PCM) represents a sustainable solution due to its environmental safety, renewable energy sources and relatively low cost.

The implementation of an alternative mechanism for local thermal recharging would enable the land to be used for other purposes, such as agricultural activities, the construction of light structures, parking areas, or the development of tree-lined pathways [1].



Heat Exchanger
in the building:
radiators,
floor heating, wall
heating, etc.

PCM tank

HGHEs

Figure 1 Geothermal installations with horizontal ground heat exchangers (HGHEs) including PCM melting chart

For the purposes of CFD simulations with the ANSYS Fluent program of a vertically positioned tank with dimensions 350/250/150, filled with a product with the characteristics of Rubitherm RT - 21, for two areas of the tank, for which temperature changes during cooling of 27.4 °C and 26.2 °C in a refrigerator over time were previously measured.

Aim:

Application of a simulation algorithm to describe experimental data obtained from the cooling of a PCM tank, in order to predict the temperature behavior of the PCM tank at all points of the tank.

Research

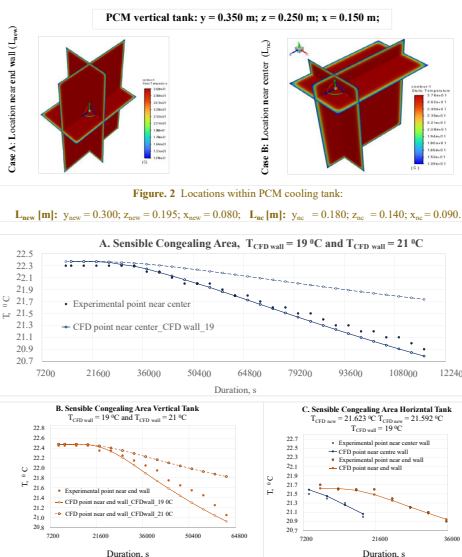


Figure 3 Numerical simulations of wall sensible phase change processes in both Case A, and Case B, using ANSYS Fluent and verification for horizontal tank, Case C.

Conclusions

- The comparison between the experimental measurements and the simulation results demonstrates that the applied numerical algorithm reliably predicts the temperature variations within the investigated regions and accurately describes the temperature field throughout the entire volume of the tank.
- The temperature regime of the tank walls was determined, thus successfully completing the verification. With the simulation model thus determined, the temperature at each point of the tank volume can be predicted over time and the thermal expansion of the studied volume can be uniquely determined.

Reference:

1. Stefanova, K. V. Determination of boundary conditions from experimental data for computational fluid dynamics simulations for phase change material solutions in the ground mass with emphasis on ground heat exchangers. BULGARIAN CHEMICAL COMMUNICATIONS, 2025, 57, 2, 78-84. DOI: 10.34049/bcc.57.2.5691

Acknowledgement: This work is supported by Bulgarian National Science Fund under Contract No KII-06-M97/5 - 10.12.2025.

Нетуберкулозни микобактерии в хранителната верига – източници и риск

Юлияна Атанасова, Станислава Йорданова, Светослав Йорданов,
Любомира Боянова, Теодора Асенова, Лора Велева

Национален център по заразни и паразитни болести

Нетуберкулозните микобактерии (НТМ) представляват хетерогенна група екологични микроорганизми от род *Mycobacterium*, широко разпространени в почва и вода. Те се отличават с повишена способност за образуване на биофилми и устойчивост към екстремни условия, лекарствени препарати и дезинфектанти. При здрави хора рискът от инфекция е нисък, но за имunosупресирани, възрастни, хора с хронични белодробни заболявания той е реален.

Сред клинично значимите видове са *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*.

НТМ контаминират храната най-често чрез използваната вода - питейна или използваната при обработката на храни, лед и напитки. Изолирани са от непастеризирано мляко, месо или пресни и замразени плодове и зеленчуци, особено листни зеленчуци [1].

Въпреки че насоките на СЗО (WHO Guidelines for Drinking-water Quality) признават НТМ като опортюнистични патогени, те не са включени като задължителен параметър за рутинен мониторинг на храна и питейната вода и не са определени международни регулаторни гранични стойности [2].

Термичната обработка значително редуцира жизнеспособността им, а документираните случаи на вероятно заболяване вследствие на хранителен прием са редки и се свързват с HIV позитивни пациенти [3].

В заключение, НТМ представляват опортюнистични микроорганизми без установени международни регулаторни гранични стойности в храни и питейна вода. Контролът се основава предимно на добри хигиенни и инженерни мерки за управление на водните системи, а не на специфичен рутинен микробиологичен мониторинг за НТМ.

Ключови думи: *нетуберкулозни микобактерии, изолиране, плодове, зеленчуци*

Nontuberculous mycobacteria in the food chain – sources and risk

Yuliana Atanasova, Stanislava Yordanova, Svetoslav Yordanov,

Lyubomira Boyanova, Teodora Asenova, Lora Veleva

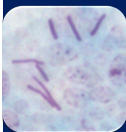
National Centre of infectious and parasitic diseases

Nontuberculous mycobacteria (NTM) are a heterogeneous group of environmental microorganisms belonging to the genus *Mycobacterium*, widely distributed in soil and water. NTM are characterized by an ability to form biofilms and a notable resistance to disinfectants. In immunocompetent individuals, the risk of infection is low; however, immunosuppressed patients, elderly individuals, and those with chronic lung diseases are at increased risk.

Clinically significant species include *M. avium*, *M. intracellulare*, and *M. kansasii*. NTM can contaminate food primarily through water used for drinking, food processing, ice production, and drinks. They have been isolated from unpasteurized milk, meat, and fresh or frozen fruits and vegetables, particularly leafy greens [1].

Although the WHO Guidelines for Drinking-water Quality recognize NTM as opportunistic pathogens, they are not included as mandatory parameters in routine monitoring of food and drinking water, and no international regulatory limit values have been established [2]. Heat treatment substantially reduces their viability and documented cases of probable foodborne illness are rare, primarily reported in HIV-positive patients [3]. In conclusion, NTM are opportunistic microorganisms for which no international regulatory thresholds in food and drinking water exist. Control strategies rely mainly on good hygiene practices and engineering measures in water system management, rather than on routine microbiological monitoring for NTM.

Key words: *nontuberculous mycobacteria, culture; fruits; vegetables*



НЕТУБЕРКУЛОЗНИ МИКОБАКТЕРИИ (НТМ) В ХРАНИТЕЛНАТА ВЕРИГА ИЗТОЧНИЦИ И РИСК

Ю. Атанасова¹, С. Йорданова¹, С. Йорданов¹, Л. Боянова¹, Т.
Асенова², Л. Велева¹

¹ - НЦЗПБ, София, ² – МДЛ „CibaLab“



УВОД

Нетуберкулозните микобактерии (НТМ) представляват хетерогенна група екологични микроорганизми от род *Mycobacterium*, широко разпространени в почва, вода и урбанизирана среда.

Те се отличават с повишена способност за образуване на биофилми и устойчивост към екстремни условия, лекарствени препарати, дезинфектанти и др. [1].

БИОЛОГИЧНИ ОСОБЕНОСТИ

Клетъчна стена

Богата на липиди (миколови киселини), отговорна за високата резистентност [1].

Устойчивост

На екстремни условия (засушаване, Т градиенти, промяна на соленост и pH), дезинфектанти, антимикробни средства и препарати [1].

Адхезия

Хидрофобна клетъчна повърхност, улесняваща прикрепване [1].

Образуване на биофилми

Осигурява персистиране в тръби, резервоари и др. [1].

ПЪТ НА КОНТАМИНАЦИЯ



Почва/ Вода

(екологични резервоари)



Водни системи в урбанизирана среда
(тръби, резервоари, охладителни системи)



Питейна вода/ Технологична вода/ Лед и напитки



Храни

непастеризирано мляко, пресни и замразени плодове и зеленчуци, особено листни зеленчуци)

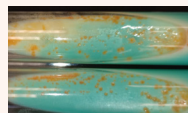


Човек

(експозиция при хранене и пиене)

Клинично значими видове

M. avium complex
M. intracellulare
M. kansasii
M. abscessus sp.



M. bulgarium sp. nov. (снимка НРЛ ТБ) [4]
Новооткрит в клинични проби рядък вид



Рискови групи

Възрастни хора
Имуносупресирани пациенти (HIV позитивни, химиотерапия ..)
Пациенти с хронични белодробни заболявания.

Нисък риск от инфекция за здрави индивиди!

Термичната обработка значително редуцира жизнеспособността на НТМ [2].

НТМ са признати като опортюнистични патогени и са включени в WHO Guidelines for Drinking-water Quality, но не са задължителен параметър за рутинен мониторинг на храна и питейната вода, като не са определени международни регулаторни гранични стойности [3].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ: Нетуберкулозните микобактерии представляват устойчиви екологични микроорганизми с потенциално значение за общественото здраве!!! Основният риск произтича от тяхното персистиране във всички водни системи и формиране на биофилми.

!!! Контролът се базира на превенция, а не е регулаторен мониторинг.

Благодарности: Прочуването е осъществено с подкрепата на ФНИ: КП-06-M91/2/03.12.2025

ЛИТЕРАТУРА: 1. Honda JR, Viridi R, Chan ED. Global Environmental Nontuberculous Mycobacteria and Their Contemporaneous Man-Made and Natural Niches. *Front Microbiol.* 2018 Aug 30;9:2029. 2. Dziedzinska Rat al. M. Nontuberculous Mycobacteria on Ready-to-Eat, Raw and Frozen Fruits and Vegetables. *J Food Prot.* 2016 Aug;79 3. WHO (2011) Guidelines for Drinking Water Quality. 4th Edition World Health Organization, Geneva, Switzerland. 4. Zimenkov D, Atanasova Y, Ushtanit A, Yordanova S, Baykova A, Filipova M, Semenova U, Mokrousov I, Bachiyska E. The Intriguing Pattern of Nontuberculous Mycobacteria in Bulgaria and Description of *Mycobacterium bulgaricum* sp. nov. *International Journal of Molecular Sciences.* 2024; 25(19):10434.



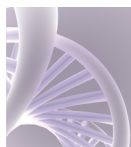
Пчелни продукти – информиран и разумен избор

Виктория Монева

Център за оценка на риска по хранителната верига

Пчелните продукти (мед, восък, прополис, пчелно млечице, цветен прашец, перга, пчелна отрова) са естествени продукти, които служат за храна и защита на кошера. Пчелните продукти са неизчерпаеми източници на биоактивни съединения – флавоноиди, полифеноли, витамини и минерали, които притежават антиоксидантни, противовъзпалителни, антибактериални, антивирусни и имуномодулиращи свойства. Те се използват широко в народната медицина, а употребата на пчелни продукти с цел подпомагане на превенцията и лечението на заболявания се нарича апитерапия. Съществуват множество научни изследвания за въздействието на продукти като мед, прополис, пчелно млечице, цветен прашец, перга и пчелна отрова, върху здравословното състояние на хората, което ги прави ценна хранителна добавка. Ползите от приема на пчелни продукти се гарантират при правилна и безопасна употреба.

Ключови думи: *пчелни продукти, безопасна употреба, здраве*



Bee products – an informed and sensible choice

Viktoriya Moneva

Risk Assessment Center on Food Chain

Bee products (honey, wax, propolis, royal jelly, pollen, royal jelly, bee venom) are natural products that serve as food and protection for the hive. Bee products are inexhaustible sources of bioactive compounds – flavonoids, polyphenols, vitamins and minerals, which have antioxidant, anti-inflammatory, antibacterial, antiviral and immunomodulatory properties. They are widely used in folk medicine, and the use of bee products to help prevent and treat diseases is called apitherapy. There are numerous scientific studies on the impact of products such as honey, propolis, royal jelly, pollen, royal jelly and bee venom on human health, which makes them a valuable nutritional supplement. The benefits of consuming bee products are guaranteed when used correctly and safely.

Key words: *bee products, safe use, health*

ПЧЕЛНИ ПРОДУКТИ – ИНФОРМИРАН И РАЗУМЕН ИЗБОР

д-р Виктория Монева, Център за оценка на риска по хранителната верига, vmoneva@mzh.government.bg

Рискове

Пчелните продукти (мед, восък, прополис, пчелно млечице, пчелен (цветен) прашец, перга, пчелна отрова) са естествени продукти, които служат за храна на пчелите и защита на кошерта. Те са неизчерпаем източник на биологични съединения – флавоноиди, полифеноли, витамини и минерали, които притежават антиоксидантни, противовъзпалителни, антибактериални, антивирусни и имуномодулиращи свойства. Пчелните продукти се използват широко в народната медицина, а употребата им, с цел подпомагане на превенцията и лечението на заболявания при хора, се нарича апипитерия. Съществуват множество научни проучвания за въздействието на мед, прополис, пчелно млечице и прашец, перга и пчелна отрова, върху здравословното състояние на хората, което ги прави ценна хранителна добавка. Ползите от приема на пчелни продукти се гарантират при правилна и безопасна употреба.

Ключови думи: пчелни продукти, безопасна употреба, здраве

ПОЛЗИ ОТ ПЧЕЛНИТЕ ПРОДУКТИ

- ✓ Богати са на ценни хранителни вещества: аминокиселини, витамини, магнез и микроелементи
- ✓ Съдържат антиоксиданти
- ✓ Подобрят метаболизма
- ✓ Имат антибактериално, антивирусно и противовъзпалително действие
- ✓ Укрепват имунната система
- ✓ Могат да се използват за допълнително подпомагане лечението на остри и хронични заболявания

ПЧЕЛЕН МЕД

- Нектарен (монофлерен и полифлерен) и маков
- Естествен подсладител
- Подпомага храносмилането
- Ускорява кашлицата
- Подобрена смес



ПЧЕЛЕН КАВЕЙ (ПРОПОЛИС)

- Богат на флавоноиди, фенолни киселини, витамини и минерали
- Ползват при стомашно-чревни и респираторни инфекции
- Помага за заздравяване на рани и изгаряния



ПЧЕЛЕН (ЦВЕТЕН ПРАШЕЦ)

- Богат на протеини, полифеноли, аминокиселини и витамини
- Стимулира апетита
- Регулира стомашно-чревните функции
- Подобрена обемната на веществата



ПЕРГА

- Продукт, получен чрез млечнокисела ферментация на цветен прашец
- Източник на протеини, витамини, минерали, мастни киселини
- Има пробиотичен ефект
- Подпомага чревната микрофлора



ПЧЕЛНО МЛЕЧИЦЕ

- Мощен природен биостимулатор, богат на витамини, протеини и аминокиселини
- Подобрена апетита и метаболизма
- Благоприятства функциите на жлезите с външна секреция



ПЧЕЛЕН ВОСКЪК

- Сложна натурална смес от над 300 съединения, основно естери на висшите мастни киселини, свободни мастни киселини, въглеводороди и алкохоли.
- Използва се основно в козметиката за приготвяне на мехлеми, балсами за устни, свещи за уши



ПЧЕЛНА ОТРОВА

- Многокомпонентна смес от неорганични и органични вещества
- Подпомага лечението на неврити и невралгии, артрити и полиартрити



ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ!

- ! Естествените захари в пчелния мед изискват повишено внимание при употреба от диабетици и хора, предразположени към запустяване
- ! Някои пчелни продукти (мед, прашец, пчелна отрова) може да причинят алергични реакции
- ! Пчелното млечице не се препоръчва за хора с хормонални проблеми

ВЪЗМОЖНИ СА ФАЛСИФИКАЦИИ НА ПОВЕЧЕТО ПЧЕЛНИ ПРОДУКТИ

БЪДЕТЕ ИНФОРМИРАНИ

Познатиите свойства на всеки пчелен продукт и възможните странични ефекти.



КАК ДА ИЗПОЛЗВАМЕ ПЧЕЛНИТЕ ПРОДУКТИ БЕЗОПАСНО?

КОНСУЛТАЦИЯ С ЛЕКАР



Преди употреба на пчелни продукти е необходима консултация с лекар, особено при прием на специфични лекарства, алергии, аутоимунни заболявания и бременности.

Прилагането на някои пчелни продукти (пчелна отрова) трябва да е под строг лекарски контрол.

ДОВЕРЕН ПРОИЗВОДИТЕЛ



Доставката от доверен производител гарантира произхода, състава и качеството на пчелните продукти.



ИНДИВИДУАЛНА ДОЗИРОВКА

Пчелните продукти съдържат биологични съединения и е необходимо да се спазва умерена употреба и индивидуална дозировка.



ПРАВИЛНИ УСЛОВИЯ ЗА СЪХРАНЕНИЕ

Всички пчелни продукти имат специфични характеристики и трябва да се съхраняват правилно при подходящи за тях условия.

ИНФОРМИРАНИЯТ ИЗБОР Е КЛЮЧЪТ КЪМ РАЗУМНА И ПОЛЗОТВОРНА УПОТРЕБА НА ПЧЕЛНИ ПРОДУКТИ

Когато имунитетът се обърне срещу организма: биология на цитокиновата буря

Огнян Москов¹, Красимира Генова²

*1 Медицински университет – София, Медицински факултет, 2
Лесотехнически университет – София, Факултет по ветеринарна
медицина*

Цитокиновата буря представлява тежък патологичен имунен отговор, характеризиращ се с прекомерно освобождаване на провъзпалителни цитокини и неконтролирано възпаление. В нормални условия цитокините регулират защитата срещу патогени, но при нарушена регулация те могат да причинят сериозни увреждания на тъканите и органите.

При хората цитокинова буря се наблюдава при инфекции като COVID-19 и грип, където прекомерният имунен отговор води до увреждане на белите дробове, остър респираторен дистрес синдром и органна недостатъчност. При животните подобни механизми се наблюдават при високопатогенна инфлуенца по птиците, котешки инфекциозен перитонит и сепсис при кучета, при които прекомерното възпаление предизвиква тежко клинично протичане и висока смъртност.

Основна роля в този процес имат имунни клетки като макрофаги и лимфоцити, които отделят интерлевкини и тумор-некротизиращ фактор. Разбирането на механизмите на цитокиновата буря е от съществено значение за разработването на нови терапевтични подходи и контрол на възпалението.

Ключови думи: цитокинова буря, имунен отговор, възпаление, човек, животни

When immunity turns against the host: the biology of cytokine storm

Ognian Moskov¹, Krasimira Genova²

1 Medical University – Sofia, Faculty of Medicine, 2 University of Forestry – Sofia, Faculty of Veterinary Medicine

Cytokine storm is a severe pathological immune response characterized by excessive release of pro-inflammatory cytokines and uncontrolled inflammation. Under normal conditions, cytokines regulate host defense, but dysregulation may lead to tissue and organ damage.

In humans, cytokine storm occurs in infections such as COVID-19 and influenza, leading to lung injury, acute respiratory distress syndrome, and organ failure. In animals, similar mechanisms are observed in highly pathogenic avian influenza, feline infectious peritonitis, and canine sepsis, where excessive inflammation results in severe disease and high mortality. Immune cells such as macrophages and lymphocytes play a central role by releasing mediators including interleukins and tumor necrosis factor. Understanding these mechanisms is essential for developing new therapeutic strategies and controlling inflammation.

Keywords: *cytokine storm, immune response, inflammation, humans, animals*

Potential of *Scenedesmus* spp. microalgae for application in the animal husbandry

Maya Margaritova Zaharieva¹, Dimitrina Zheleva-Dimitrova², Pelagia Foka³, Erini Karamichali³, Tanya Chan Kim¹, Vessela Balabanova-Bozushka², Yana Ilieva¹, Mila Kaleva¹, Anna Brachkova¹, Reneta Gevrenova², Stanislav Philipov⁴, Sevda Naydenska⁵, Urania Georgopoulou³, Alexander Kroumov¹ and Hristo Najdenski¹

¹ The Stephan Angeloff Institute of Microbiology, Bulgarian Academy of Sciences, 1113 Sofia, Bulgaria; ² Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Medical University of Sofia, 1000 Sofia, Bulgaria; ³ Department of Microbiology, Laboratory of Molecular Virology, Hellenic Institute Pasteur, Vasilisis Sofias 127, 11521 Athens, Greece; ⁴ Department of Human Anatomy, Histology, General and Clinical Pathology and Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Hospital Lozenetz, Sofia University "St. Kliment Ohridski", 2 Kozjak St, 1407 Sofia, Bulgaria; ⁵ Faculty of Medicine, Alexandrovska Hospital, Medical University of Sofia, 1431 Sofia, Bulgaria

Acknowledgement: This study was financed by Grants of the Bulgarian National Science Fund KT-06-H37/2 (11 November 2021) and KT-06-H37/12 (06 December 2019)

INTRODUCTION

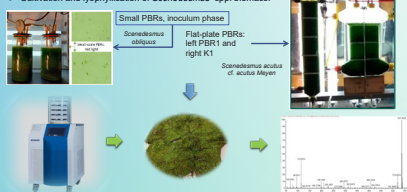
Important current approach to overcome the antimicrobial resistance is the use of various types of extracts, including microalgae, to stimulate the immune system in humans and animals and prevent infectious diseases. Objectives of the present study were to investigate the pharmacological potential of two *Scenedesmus* spp.:

- 1) The antimicrobial activity of combinations between clinically applied antibacterial drugs and dichloromethane extract from biomass of the microalgae *Scenedesmus obliquus*, cultivated in an innovative small photobioreactor under the influence of internal red or green and external white LED lights; and
- 2) The antiviral effect of dichloromethane extract from the microalgae *Scenedesmus acutus* d. *acutus* Meyen against bovine coronavirus.

MATERIALS AND METHODS

Microalgae extracts^{1,2}:

Cultivation and lyophilisation of *Scenedesmus* spp. biomass:



Dichloromethane extracts were obtained from the biomass of both species and characterized with UHPLC-MS/MS. The extract are rich on carotenoids and unsaturated fatty acids¹

Evaluation of antibacterial activity

- ISO 20776:1-2006 on food pathogens (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*) – determination of minimal inhibitory concentrations (MIC)
- Combinations between dichloromethane extracts and clinically applied antibiotics – penicillin, ciprofloxacin and enrofloxacin
- Checkerboard test – MIC in combinations (MIC₂)
- Method of the fraction inhibitory concentrations (FIC)

$$FIC(A) = \frac{MIC(A)}{MIC(A)} \quad FIC(B) = \frac{MIC(B)}{MIC(B)}$$

$$\sum FIC = FIC(A) + FIC(B)$$

Interpretation of the results:
 $2FIC \leq 0.5$ – synergism
 $0.5 < 2FIC \leq 1$ – additive effect
 $1 < 2FIC \leq 4$ – indifference
 $2FIC > 4$ – antagonism

Evaluation of antiviral activity

- Virus strain – bovine coronavirus S379 Riems (022V-04370 Beta-coronavirus 1, FLI WOAH Collaborating Centre for Zoonoses in Europe, Insel Riems, Greifswald, Germany)
- Cell Viability Assay according to ISO 10993-5 (Annex C) – two treatment schemes:

Treatment scheme 1 – pre-incubation of the BCoV with PBR1 or K1 extract for 1 h at 37 °C.

Treatment scheme 2 – direct treatment approach;

cytopathic effect.

Microscopic evaluation of antiviral activity –

- rNA isolation from the supernatant of the treated samples
- Reverse transcription with 1 ng viral RNA
- Nucleic acid PCR on the Bio-Rad qPCR system
- Primer/probe set targeting the nucleocapsid gene of the BCoV:

forward primer 5'-GGACCCAGATGACGACGAG-3'

reverse primer 5'-GACCTCTCTGACCTCTCAAT-3'

probe 6-FAM-5'-ATTCGACTAGTTCCTGGCTGG-3'-BHQ1



RESULTS

1. Specific growth rate of *Scenedesmus obliquus* biomass¹:

Cultivation period (days)	Biomass dry weight (g/L)
0	0.1
5	2.18
10	2.41
21	4.79
29	5.57
36	5.55

$$\mu = \frac{\ln(X(2)) - \ln(X(1))}{(t(2) - t(1))}$$

$$\mu = 0.043 \text{ d}^{-1}$$

2. Phytochemical composition of *S. obliquus* and *S. acutus* biomass^{1,2}:

Microalgae Strain, photobioreactor	Flavonoids (%) (g/100 g dw)	Polyphenols (%) (g/100 g dw)	Chlorophyll a (mg/g dw)	Chlorophyll b (mg/g dw)	Total Carotenoids (mg/g dw)	Lipids (%) (g/100 g dw)
<i>S. obliquus</i> , green light, SC-PBR1	0.85 ± 0.11	1.49 ± 0.15	16.38 ± 0.44	6.73 ± 0.21	5.49 ± 0.18	8.88 ± 0.12
<i>S. obliquus</i> , red light, SC-PBR2	0.61 ± 0.09	2.15 ± 0.07	16.80 ± 0.28	7.88 ± 0.29	5.14 ± 0.15	8.97 ± 0.13

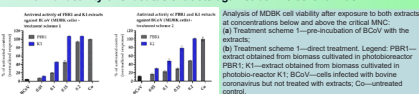
Photobioreactor	Flavonoids (%) (g/100 g dw)	Polyphenols (%) (g/100 g dw)	Chlorophyll a (mg/g dw)	Chlorophyll b (mg/g dw)	Total Carotenoids (mg/g dw)	Lipids (%) (g/100 g dw)
K1	0.40 ± 0.02	2.08 ± 0.62	6.68 ± 0.51	2.96 ± 0.09	1.27 ± 0.08	21.57 ± 0.75
PBR1	0.23 ± 0.01	1.38 ± 0.12	4.62 ± 0.32	1.79 ± 0.71	0.35 ± 0.01	18.87 ± 0.43

3. Antibacterial activity of combinations between *S. obliquus* extracts and clinically applied antibacterial drugs¹:

Strain	Antibacterial drug (AB)	Extract	MIC ₂ (mg/L)	MIC ₂ (mg/L)	FIC ₂ (mg/L)	FIC ₂ (mg/L)	Effect
<i>S. aureus</i>	PEN	E1	0.01	0.0025	0.0008	0.5	3.0008
		E2	0.01	0.0025	0.0008	0.5	3.0008
	CIP	E1	0.01	0.0025	0.0008	0.25	0.2508
		E2	0.01	0.0025	0.0008	0.25	0.2508
<i>E. coli</i>	ENR	E1	0.01	0.05	0.0008	1	1.0008
		E2	0.01	0.05	0.0008	1	1.0008
	CIP	E1	0.01	0.0025	0.0008	0.5	0.5008
		E2	0.01	0.0025	0.0008	0.5	0.5008
<i>S. typhimurium</i>	ENR	E1	0.01	0.0025	0.0008	0.5	0.5008
		E2	0.01	0.0025	0.0008	0.5	0.5008
	CIP	E1	0.01	0.0125	0.0008	0.25	0.2508
		E2	0.01	0.0125	0.0008	0.25	0.2508
<i>S. aureus</i>	CIP	E1	0.01	0.0025	0.0008	0.5	0.5008
		E2	0.01	0.0025	0.0008	0.5	0.5008

Legend: PEN – penicillin; CIP – ciprofloxacin; ENR – enrofloxacin

4. Antiviral activity of *S. acutus* extracts against bovine coronavirus¹:



Extract	IC ₅₀ (μg/mL)	IC ₅₀ (μg/mL)	IC ₅₀ (μg/mL)	IC ₅₀ (μg/mL)
PBR1	0.150	0.150	2.4	0.88
K1	0.127	0.281	0.30	0.94

Legend: IC₅₀ – 50% inhibitory concentration; IC₅₀ – 50% inhibitory concentration after 72 h exposure to the extracts; IC₅₀ – 50% inhibitory concentration

CONCLUSIONS

- The application of engineering solutions to create innovative PBRs in the inoculum stage resulted in quality biomass of the unexplored *Scenedesmus obliquus* strain, representing a source for extracts and compounds with significant antibacterial potential in combination with clinically applied antibiotics. Synergistic effects were observed in combinations with ciprofloxacin, whereas the combinations with penicillin or enrofloxacin led to additive effects.
- The *Scenedesmus acutus* extracts exhibited antiviral activity in concentrations 150 μg/mL or higher. The more active K1 extract revealed significant diminishment of the number of BCoV particles as compared to the untreated BCoV-infected control (log = 4.53 ± 10⁶) after incubation with 200 μg/mL K1 extract. The cytopathic effect was fully eliminated after application of 150 μg/mL of both extracts.

BIBLIOGRAPHY

- 1 M. M. Zaharieva et al., Molecules, 2022, 27, 519, DOI: 10.3390/molecules27020519.
- 2 M. M. Zaharieva et al., Fermentation, 2026, 12, 85, DOI: 10.3390/fermentation12020085.



*Център за оценка на риска по хранителната верига не носи отговорност за допуснати фактически и технически грешки в публикуваните материали на външни автори

*Risk assessment center on food chain is not responsible for any factual or technical errors in the published materials of external authors



Български контактен център,
Център за оценка на риска по хранителната верига
EFSAfocalpoint@mzh.government.bg
<http://focalpointbg.com>

**БЪЛГАРСКИ КОНТАКТЕН
ЦЕНТЪР НА EFSA –
ЦЕНТЪР ЗА ОЦЕНКА НА
РИСКА ПО
ХРАНИТЕЛНАТА ВЕРИГА**

**BULGARIAN FOCAL POINT
OF EFSA-
RISK ASSESSMENT CENTER
ON FOOD CHAIN**



<http://focalpointbg.com>



<http://corhv.government.bg>