РЪКОВОДСТВО И МЕТОДОЛОГИЯ НА ИЗМЕРВАНИЯ И ИЗСЛЕДВАНИЯ

Вземане на проби от морска вода, седименти и макроводорасли: Разширени приложения в производството на торове и биопластмаси

interreg Co-funded by the European Union
NEXT Black Sea Basin
MACRO CLEAN

Дейност 1.1. и дейност.1.2
Сформиране на изследователски екип и методология на изследване I и II

Координатор на проекта

Проф. д.н. Цветеслава Игнатова-Иванова

Шуменски университет /България

Факултет по природни науки

Telephone: +359 887 160 771

Email: ts.ignatovaivanova@shu.bg

Мениджър комуникации

Преп. Павлина Маринова

E-mail: p.marinova@shu.bg

Telephone: +359 895 029 919

Уебсайт на проекта: https://www.macroclean.org/

Този документ е базиран на дейностите по проекта MACRO CLEAN (Изследвания, методологии за почистване, икономическа валоризация и пилотно приложение за цъфтеж на макроводорасли) с финансовата подкрепа на програмата ***Interreg NEXT*** за басейна на Черно море.

За библиографски цели този документ трябва да се цитира като:
Проект MACRO CLEAN. (2025). Методологично ръководство за вземане на проби от макроводорасли, морска вода и седименти и използване на макроводорасли за приложения на торове и биопластмаси (BSB00584, програма Interreg NEXT за басейна на Черно море). Университет Синоп, 52 стр. https://www.macroclean.org/

Кореспондентски автори:
ts.ignatovaivanova@shu.bg & p.marinova@shu.bg

Interreg Co-funded by the European Union NEXT Black Sea Basin | MACRO CLEAN

Допринасящи автори:
Николай Колев, Кирил Вълканов, Марко Иванов, Иван Теленчев и Милка Делева

Дата на публикуване: септември 2025 г.
*Отговорността за съдържанието на този документ е на партньорите от проекта BSB00584 MACRO CLEAN, изпълняван по програмата **Interreg Next Black Sea Basin**. Той представлява неформален консенсус относно най-добрите практики, съгласувани от всички партньори.*

РЕЗЮМЕ

Проектът MACRO CLEAN (*Изследвания, методологии за почистване, икономическа валоризация и пилотно приложение за цъфтеж на макроводорасли*), изпълняван по програмата ***Interreg NEXT*** за басейна на Черно море (*BSB00584*), е съвместна инициатива, в която участват Университетът Синоп (SNU) и Съюзът на общините Мармара (MMU) от Турция, Държавният университет Батуми (BSU) от Грузия и Шуменският университет (ShU) от България. Проектът се фокусира върху икономическото използване на макроводораслите чрез изследвания и пилотни реализации, като същевременно има за цел да предотврати и смекчи въздействието на човешките дейности, допринасящи за еутрофикацията и цъфтежа на макроводораслите в Черноморския регион.

Основната цел на проекта е да се разработи цялостна методология за изследване на макроводорасли, да се подобри лабораторният капацитет, да се изготвят планове за осъществимост на приложения, базирани на макроводорасли, да се повиши осведомеността сред заинтересованите страни и да се насърчи сътрудничеството по отношение на иновативни технологии за почистване. Чрез справяне с регионалните предизвикателства на еутрофикацията и цъфтежа на водорасли — до голяма степен причинени от замърсяване на сушата и промени в морските екосистеми — проектът насърчава устойчивото

управление на ресурсите и се стреми да създаде трайни положителни въздействия.

Това ръководство очертава методологията, разработена съвместно от Дейност 1.1 и Дейност 1.2 за вземане на проби от макроводорасли, морска вода и седименти, както и за използване на макроводорасли в приложения за торове и биопластмаси. Чрез ангажиране на заинтересованите страни и разработване на хармонизирана методология, Дейност 1.1 и Дейност 1.2 са изготвили набор от практически насоки, предназначени да помогнат на политиците, изследователите и екологичните организации при ефективното наблюдение и прилагане на тези дейности.

Въпреки че този документ отразява колективните усилия и неформалния консенсус на всички участващи партньори, той не е задължително да представлява официалните становища на програмата Interreg NEXT.

Проф. д-р Левент БАТ
Координатор на проекта
Септември 2025 г.

interreg Co-funded by the European Union
NEXT Black Sea Basin
MACRO CLEAN

СЪДЪРЖАНИЕ

ВЪВЕДЕНИЕ 6

АКРОНИМИ 7

ЧАСТ I – ПРОУЧВАНИЯ 8

I.I. ПРОУЧВАНЕ НА БИОМАСАТА НА МАКРОВОДОРАСЛИТЕ И ТЕХНИКИ ЗА ВЗИМАНЕ НА ПРОБИ 8

I.II. ИЗБОР НА РАЙОНИ ЗА ПРОБОВЗЕМАНЕ ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ НА МАКРОВОДАРЕЛА 14

I.III. МЕСТОПОЛОЖЕНИЕ НА ПЛАНИРАНИТЕ СТАНЦИИ 16

ЧАСТ II - ТЕХНИКИ ЗА ВЗИМАНЕ НА ПРОБИ 21

II.I. ВЗИМАНЕ НА ПРОБИ ОТ МАКРОВОДОРАСЛИ 21

II.II. ВЗИМАНЕ НА ПРОБИ ОТ МОРСКА ВОДА 22

II.III. ВЗИМАНЕ НА ПРОБИ ОТ СЕДИМЕНТИ 26

ЧАСТ III- АНАЛИТИЧНИ ТЕХНИКИ 28

III.I. АНАЛИЗ НА МЕТАЛИ В МАКРОВОДОРАСЛИ 28

III.II. АНАЛИЗ НА МЕТАЛИ В МОРСКА ВОДА 28

III.III. АНАЛИЗ НА МЕТАЛИ В СЕДИМЕНТИТЕ 30

ЧАСТ IV- ОРАНЖЕРИЯ 31

IV.I. ИЗГРАЖДАНЕ НА ОРАНЖЕРИЯ 31

IV.II. РАСТЕНИЯ В ОРАНЖЕРИЯ 34

IV.III. ИЗПИТВАНИЯ ЗА РАСТЕЖ НА РАСТЕНИЯ 36

ЧАСТ V - РАСТИТЕЛНИ МАТЕРИАЛИ 36

V.I. ПРОИЗВОДИТЕЛНОСТ НА ЗЕЛЕНЧУЦИТЕ 37

V.II. РАСТИТЕЛНИ АНАЛИЗИ 38

ЧАСТ VI – ПОЧВОВИ МАТЕРИАЛИ 39

VI.I. ПОЧВЕН МАТЕРИАЛ И АНАЛИЗ 40

VI.II. НАПОЯВАНЕ НА РАСТЕНИЯ 41

ЧАСТ VII - ТОРОВЕ 41

VII.I. ТЕЧЕН ТОР 41

interreg Co-funded by the European Union
NEXT Black Sea Basin
MACRO CLEAN

VII.II. ТВЪРД ТОР 44
VII.III. КОМПОСТЕН ТОР 45
VII.IV. АНАЛИЗ НА ТОРОВЕ 46
VII.V. ПРИЛОЖЕНИЕ НА ХИМИЧЕСКИ ТОРОВЕ (15N, 15P, 15K) 47
ЧАСТ VIII – БИОПЛАСТМАСИ 47
VIII.I. ПРОЦЕДУРА ЗА ЕКСТРАКЦИЯ 47
VIII.II. ПРИГОТВЯНЕ НА БИОФИЛМ 48
VIII.III. ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ФИЛМИТЕ 49
VIII.IV. МЕТОД НА ЕКСТРАКЦИЯ 51
ИНСТРУМЕНТИ И ОБОРУДВАНЕ 53
ЛИТЕРАТУРА 56

ВЪВЕДЕНИЕ

Обосновка

Проектът MACRO CLEAN е иницииран с цел справяне с належащи екологични предизвикателства чрез съвместните усилия на партньори от три страни от Черноморския басейн: Турция, Грузия и България. Този проект установява всеобхватна рамка за изследвания и пилотни приложения, фокусирани върху устойчивото и ефективно събиране, оценка и икономическа валоризация на макроводораслите, насочени към тяхното използване като торове и биопластмаси.

За тази цел, съвместно разработена методология предоставя ясни насоки за вземане на проби от макроводорасли, морска вода и седименти, както и за тяхното използване в различни икономически сектори. Това ръководство представя интегрирана методология за изследване, обхващаща четири основни компонента: теренни проучвания, техники за вземане на проби, аналитични процедури и приложни изследвания.

Освен това, той подчертава практическите приложения и иновативните подходи за използване на макроводорасли, илюстрирани чрез казуси и пилотни проекти, свързани с торове и биопластмаси. Чрез осигуряване на методологична последователност и подобряване на качеството на данните,

interreg Co-funded by the European Union
NEXT Black Sea Basin
MACRO CLEAN

тези компоненти целят да улеснят споделянето на знания между изследователи, институции и заинтересовани страни, ангажирани с насърчаването на устойчивото използване на морските ресурси в Черноморския регион и отвъд него.

Благодарности

С настоящото изказваме искрената си благодарност на всички, които допринесоха за подготовката на това методологично ръководство. Особено сме задължени на *Николай Колев*, *Кирил Вълканов*, *Марко Иванов*, *Иван Теленчев* и *Милка Делева* – за тяхното ръководство, експертен опит и конструктивни препоръки през различните етапи на това проучване. Тяхната непоколебима подкрепа и научен принос изиграха значителна роля за повишаване на цялостното качество и прецизност на тази публикация.

Важно съобщение: Отговорността за съдържанието на този материал е на автора(ите). Съдържанието на този материал не представлява непременно официалната позиция на Европейския съюз. Възпроизвеждането е разрешено, при условие че е посочен източникът и всички промени са посочени.

АКРОНИМИ

AAS	Атомно-абсорбционна спектроскопия
AFM	Атомно-силова микроскопия
Al	Алуминий
Ca	Калций
$CaCl_2$	Калциев хлорид
Co	Кобалт
Cr	Хром
Cu	Мед
DO	Разтворен кислород
E223	Натриев метабисулфит
EC	Електропроводимост
EVA	Етилен-винилацетат
Fe	Желязо
FTIR	Фурие-трансформация Инфрачервена спектроскопия
HCl	Солна киселина
Hg	Живак
HNO_3	Азотна киселина

ICP-MS	Индуктивно свързана плазмена масспектрометрия
IR	Инфрачервена спектроскопия
K	Калий
KOH	Калиев хидроксид
Mg	Магнезий
Mn	Манган
N	Азот
Na	Натрий
Na_2CO_3	Натриев карбонат
Ni	Никел
P	Фосфор
ppm	Части на милион
Sb	Антимон
Se	Селен
SEM	Сканиращ електронен микроскоп
Sn	Калай
TGA	Термогравиметричен анализ
UV	Ултравиолетова
W/V	Тегло/Обем
XRD	Рентгенова дифракция
Zn	Цинк

ЧАСТ I – ПРОУЧВАНИЯ

I.I. ПРОУЧВАНЕ НА БИОМАСАТА НА МАКРОВОДОРАСЛИТЕ И ТЕХНИКИ ЗА ВЗИМАНЕ НА ПРОБИ

Проучване на биомасата на макроводораслите се провежда в крайбрежни водни пунктове, като проби се вземат от поне три различни места в рамките на площ от приблизително 15 x 15 метра и на дълбочина 0–1 метър, за да се осигури регионална представителност (Фигури 1 и 2).

За събиране на пробите се използва квадрат 20 x 20 см (400 см²), както е описано в методологията на Bouiadjra et al. (2021) (Фигура 3а). Пробите се събират ръчно с помощта на шпатула, първоначално се поставят в найлонови торбички и впоследствие се прехвърлят в пластмасови буркани, пълни с морска вода (Фигура 3б). За

interreg Co-funded by the European Union NEXT Black Sea Basin MACRO CLEAN

консервиране се добавя разтвор на формалдехид и морска вода в концентрация 2–5%, както е препоръчано от ÇŞB-ÇEDİDGM и TÜBİTAK-MAM (2017) (Фигура 3в).



Фигура 1. Проучване на биомасата



Фигура 2. Вземане на проби от макроводорасли

Interreg NEXT Black Sea Basin Co-funded by the European Union MACRO CLEAN



Фигура 3. (а) Квадрат, (б) Пластмасови буркани и (в) Формалдехид

След като пристигнат в лабораторията, пробите се изплакват с дестилирана вода, за да се отстранят всички чужди материали, като камъни, пясък или епифити (Фигура 4). Почистените проби се поставят върху попивателна хартия, за да се отстрани излишната вода (Фигура 5), и след това се сушат в пещ при 60°C в продължение на 48 часа (Srijaya et al., 2010; Fernández-Aláez & Fernández-Aláez, 2011; Setthamongkol et al., 2015) (Фигура 6). След изсушаване макроводораслите се претеглят и се извършва таксономична идентификация на проби, които са били отделени от чужди материали, като се използва микроскопско изследване, когато е необходимо.

За макроводорасли, предназначени за химичен анализ, се събират отделни проби независимо от изследването на биомасата. Тези проби се изплакват с дейонизирана вода, почистват се от макроскопични епизои и епифити и след това се сушат в лабораторна фурна при 60°C в продължение на 48 часа. Изсушеният материал впоследствие се смила на фин прах с помощта на хаванче и пестик (Фигура 7). Този процес гарантира, че пробите от макроводорасли са точно подготвени както за количествено определяне на биомасата, така и за подробен химичен анализ.

interreg Co-funded by the European Union
NEXT Black Sea Basin
MACRO CLEAN

Измерванията на биомасата на идентифицираните проби от водорасли се извършват с помощта на аналитичен баланс с чувствителност 0.0001 g. Количествените проби от макроводорасли се преобразуват в биомаса на единица площ (g сухо тегло/m²). За да се разберат по-добре сезонните модели на разпределение на бентосните водораслови съобщества по крайбрежието, средните стойности на данните за видовете макроводорасли се подлагат на статистически анализ. Освен това ще бъдат проведени in situ измервания на параметри на околната среда като pH, температура, соленост и разтворен кислород с помощта на многопараметрично устройство (Фигура 8).



Фигура 4. Почистване и идентификация на видовете

interreg Co-funded by the European Union
NEXT Black Sea Basin
MACRO CLEAN



Фигура 5. Отстраняване на излишната вода от проби върху хартия



Фигура 6. Сушене на пробите в пещ

Interreg NEXT Black Sea Basin
Co-funded by the European Union
MACRO CLEAN



Фигура 7. Прахообразни проби

Interreg Co-funded by the European Union
NEXT Black Sea Basin
MACRO CLEAN



Фигура 8. Измерване на физични параметри на място

I.II. ИЗБОР НА РАЙОНИ ЗА ПРОБОВЗЕМАНЕ ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ НА МАКРОВОДАРЕЛА

Станциите* (*полигони) се избират въз основа на следните критерии:

а. Характеристики на крайбрежието*:* За вземане на проби са насочени разнообразни видове субстрати, като песъчливи, скалисти и

Interreg Co-funded by the European Union NEXT Black Sea Basin MACRO CLEAN

кални среди. Тези разнообразни субстрати играят важна роля в разпространението и растежа на макроводораслите.

b. Близост до човешки дейности*:* Избират се райони с високо антропогенно влияние (напр. селскостопански оттичащи води, зауствания на градски отпадъчни води) и по-слабо засегнати, относително девствени райони. Този контраст позволява оценка на предизвиканите от човека ефекти. За да се разбере пълният обхват на въздействието върху околната среда върху растежа на макроводораслите и крайбрежните екосистеми, и е изключително важно да се изберат както райони с високо антропогенно влияние, така и такива, които остават относително незасегнати. Районите, засегнати от селскостопански оттичащи води и зауствания на градски отпадъчни води, често изпитват повишени нива на хранителни вещества, като азот и фосфор, които допринасят за еутрофикация и цъфтеж на макроводорасли. Тези райони предлагат ценна информация за преките последици от човешките дейности върху морските екосистеми. За разлика от тях, по-слабо засегнатите и относително девствени райони служат като референтни места, където доминират естествените процеси, осигурявайки база за сравнение. Чрез сравняване на тези два типа среди става възможно да се оцени степента на предизвиканите от човека промени и да се оцени ефективността на стратегиите за управление, насочени към смекчаване на влошаването на околната среда. Този двоен подход подобрява разбирането на екологичните последици от човешките дейности и спомага за разработването на по-устойчиви практики за управление на крайбрежните зони.

c. Достъпност и осъществимост на вземане на проби: Местата са лесно достъпни през цялата година и са подходящи за многократно сезонно вземане на проби, за да се осигури последователен мониторинг и събиране на данни.

d. Представителност: Избраните станции точно отразяват общото екологично състояние на бреговата линия. Те са подходящи за дългосрочен мониторинг, което позволява непрекъснато или многократно събиране на данни за продължителни периоди. Този

дългосрочен подход е от съществено значение за проследяване на промените в екосистемата, идентифициране на тенденции във времето и оценка на ефективността на усилията за управление или опазване.

е. Пространствена променливост: Станциите са разположени на достатъчно разстояние, за да се улови пространствената хетерогенност. Това помага да се анализира променливостта в различните региони и градиенти на околната среда.

ƒ. Ресурсен потенциал: Приоритет се дава на райони с разнообразие и биомаса от макроводорасли. По-специално, предпочитат се региони с видове, подходящи за производство на торове и биопластмаси.

I.III. МЕСТОПОЛОЖЕНИЕ НА ПЛАНИРАНИТЕ СТАНЦИИ* (*полигони)

Това проучване е предназначено да изследва произхода и динамиката на свръхрастеж на макроводорасли и еутрофикация в региона, с фокус върху идентифициране на екологичните и антропогенните фактори, които допринасят за тези явления.

Ключова цел на изследването е да се подпомогне устойчивото използване на макроводорасли чрез приложения като производство на торове и биопластмаси. Изследването е съсредоточено специално върху доминиращите видове макроводорасли в региона, по-специално *Ulva spp.* и *Cystoseira sp.* (Фигури 9 и 10). Тези видове са проби, за да се оценят различни фактори, включително плътността и сезонните модели на растеж на макробентосните водорасли, както и хранителния състав на макроводораслите, морската вода и седиментите.

interreg Co-funded by the European Union NEXT Black Sea Basin MACRO CLEAN



Фигура 9. Вид *Ulva* sp.



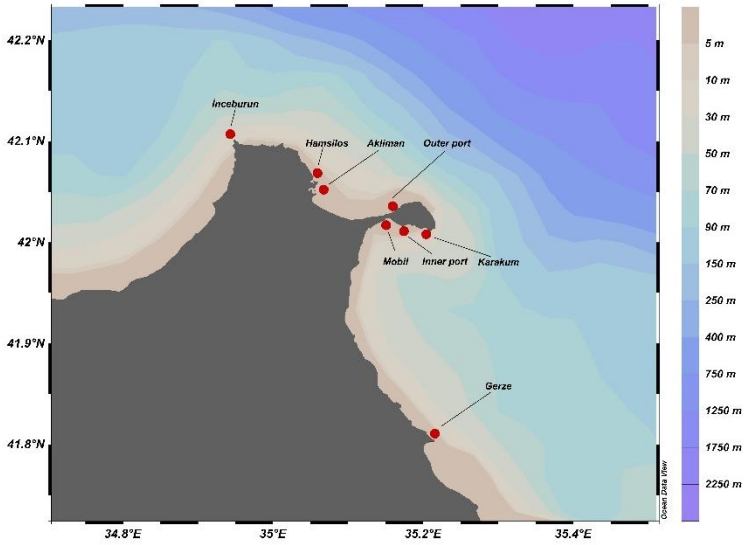
Фигура 10. Вид *Cystoseira* sp.

Както е посочено в дизайна на изследването, районите за вземане на проби бяха избрани въз основа на предварително определени критерии. В провинция Синоп (Турция) избраните места включват Инджебурун, Хамсилос, Аклиман, Външно пристанище (Диш Лиман), Каракум, Вътрешно пристанище (Ич Лиман) и Мобил (Фигура 11). В България местата за вземане на проби са разположени южно от нос Емине и обхващат Бургаския залив, залива Ченгене Скеле, залива Маслен Нос, залива Петрол Харбър, Созопол и Бамбу (Фигура 12). В Грузия определените райони за вземане на проби включват Сарф, Квариати, Гонио, Зелен нос, Цихисдзири, Фоти и Кулеви (Фигура 13).

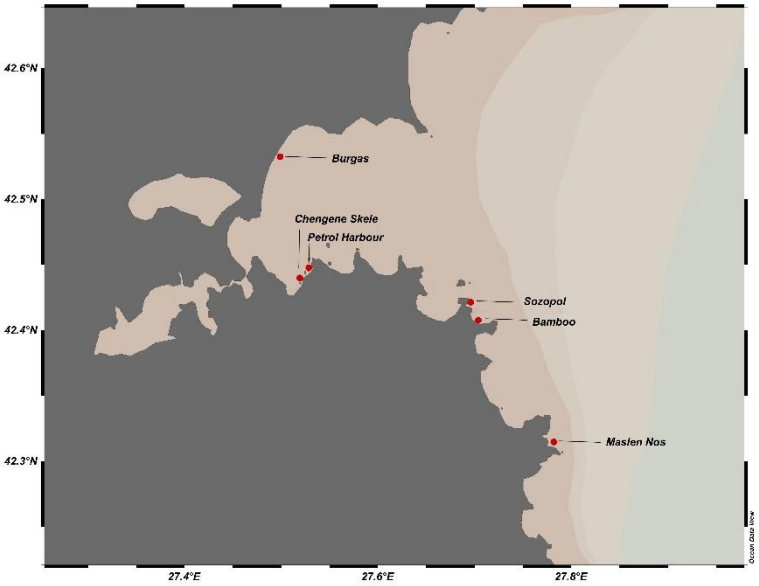
Таблица 1. Координатите (географска ширина и дължина) на станциите за вземане на проби са представени в таблицата

Име на полигон	**Географска ширина**	**Географска дължина**
İnceburun (TR)	42°5'46.38"N	34°56'40.63"E
Hamsilos (TR)	42°3'38.14"N	35°2'39.74"E
Akliman (TR)	42°3'3.31"N	35°2'37.19"E
Outer Port (TR)	42°1'51.48"N	35°9'6.32"E
Karakum (TR)	42°0'56.16"N	35°11'11.94"E
Inner Port (TR)	42°1'13.07"N	35°9'34.01"E
Mobil (TR)	42°0'36.81"N	35°7'9.87"E

Burgas Bay (BG)	42°30'16.24"N	27°29'2.87"E
Chengene Skele Bay (BG)	42°15'43.24"N	27°18'51.55"E
Maslen Nos Bay (BG)	42°18'27.17"N	27°47'24.32"E
Petrol Harbor Bay (BG)	42°26'45.36"N	27°32'4.85"E
Sozopol (BG)	42°25'20.02"N	27°41'40.29"E
Bamboo (BG)	42°24'35.49"N	27°42'20.62"E
Sarph (GE)	41°5'39.9"N	41°5'20.0"E
Kvariati (GE)	41°5'40.6"N	41°5'52.8"E
Gonio (GE)	41°5'43.85"N	41°5'56.95"E
Green Cape (GE)	41°6'96.68"N	41°7'06.14"E
Tsikhisdziri (GE)	41°7'61.02"N	41°7'42.99"E
Photi (GE)	42°0'43.66"N	41°7'27.34"E
Kulevi (GE)	42°2'48.23"N	41°6'27.75"E

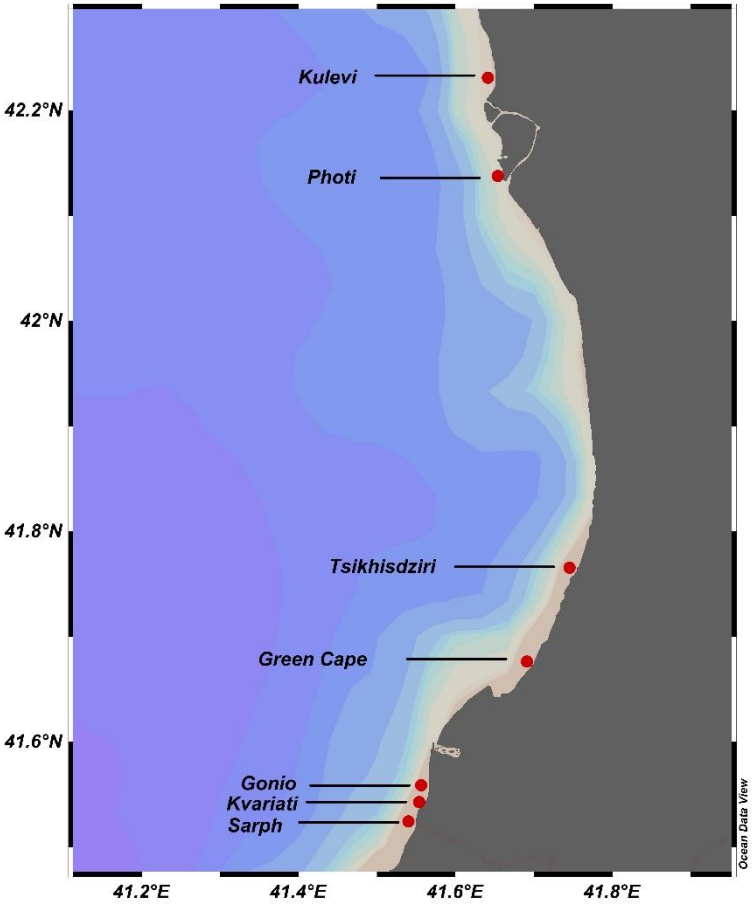


Фигура 11. Станции за вземане на проби в провинция Синоп



Фигура 12. Станции за вземане на проби в България

Interreg Co-funded by the European Union
NEXT Black Sea Basin
MACRO CLEAN



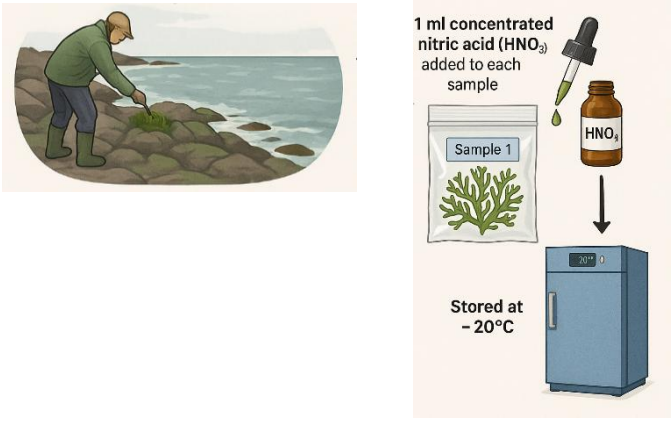
Фигура 13. Станции за вземане на проби в Грузия

ЧАСТ II - ТЕХНИКИ ЗА ВЗИМАНЕ НА ПРОБИ

Макроводорасли, морска вода и седименти

II.I. ВЗИМАНЕ НА ПРОБИ ОТ МАКРОВОДОРАСЛИ

Пробите от макроводорасли се събират сезонно от различни места по крайбрежието, за да се гарантира, че те представляват цялата изследвана област. Събраните проби се етикетират внимателно и се поставят в полиетиленови торбички за транспортиране. За да се запазят пробите за последващ анализ на метали, към всяка проба се добавя 1 ml концентрирана азотна киселина (HNO_3), за да се предотврати утаяването на метали и да се запази разтворимостта на микроелементи. След това пробите се съхраняват при -20°C, докато са готови за анализ. Този метод гарантира целостта на пробите, като ги предпазва от разграждане и замърсяване, преди да бъдат обработени в лабораторията за анализ на метали (Фигура 14).

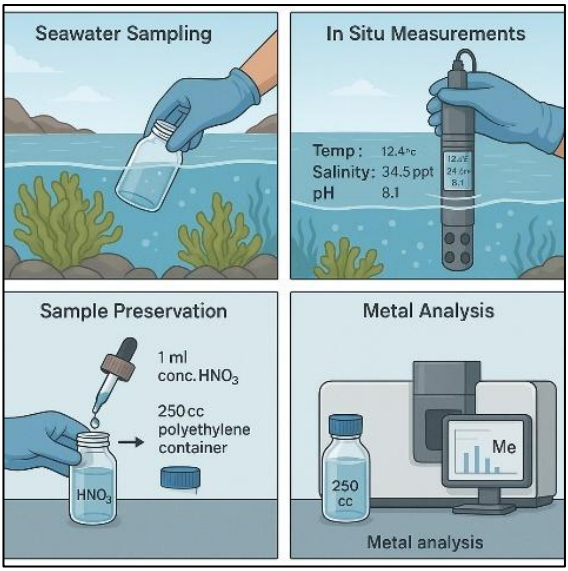


Фигура 14. Илюстрация на вземане на проби от макроводорасли

interreg Co-funded by the European Union NEXT Black Sea Basin MACRO CLEAN

II.II. ВЗИМАНЕ НА ПРОБИ ОТ МОРСКА ВОДА

Проби от морска вода се събират от места, където има макроводорасли. Тези места са избрани, за да се разбере по-добре корелацията на транслокацията на метали между морската вода и макроводораслите. В допълнение към събирането на проби, се записват измервания в реално време in situ на ключови физични параметри, като температура, соленост и pH, с помощта на многопараметърна сонда. Това осигурява цялостно разбиране на условията на околната среда по време на вземане на проби.



Фигура 15. Илюстрация на вземане на проби от морска вода

interreg Co-funded by the European Union
NEXT Black Sea Basin
MACRO CLEAN

Проби от морска вода се събрат в три екземпляра в полиетиленови контейнери от 500 ml от места, където има макроводорасли, както за анализ на метали, така и за измерване на хлорофил-*a* (Chl-*a*).

За да се запазят пробите за последващ анализ на метали, към всеки контейнер се добавя 1 ml концентрирана HNO_3. Запечатаните контейнери се съхраняват на стайна температура, далеч от пряка слънчева светлина и източници на топлина, за да се запази стабилността на пробите, докато не станат готови за лабораторен анализ. Водните проби, използвани за анализ на Chl-*a*, се филтрират с помощта на вакуумна филтрационна система след доставянето им в лабораторията (Фигура 16).



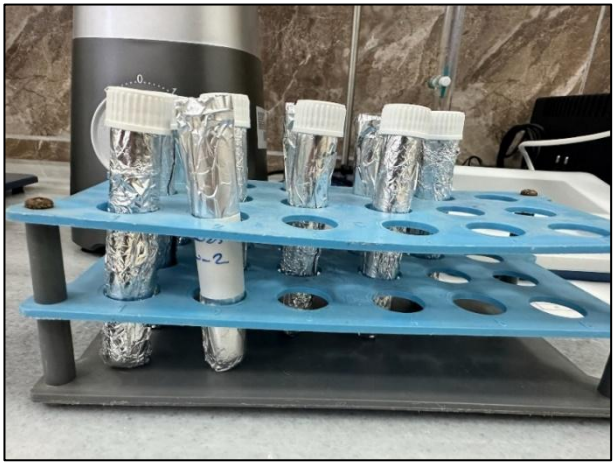
Фигура 16. Филтрационна система

<u>Определянето на Chl-a се извършва съгласно метода, даден по-долу:</u>

interreg Co-funded by the European Union
NEXT Black Sea Basin
MACRO CLEAN

За всеки анализ, 2 литра водни проби се филтрират в три екземпляра, използвайки филтърни хартии от стъклени влакна GF/C с размер на порите 0.45 µm. Преди филтриране се добавят няколко капки 1% разтвор на магнезиев карбонат ($MgCO_3$), за да се овлажнят филтърните хартии, за да се предотврати подкиселяването и да се стабилизира pH на частиците, задържани върху филтъра. След това навлажнените филтри се поставят във вакуумна филтрационна система и 2-литровите проби се филтрират под вакуум, което позволява на водораслите и други частици да се натрупат върху повърхността на филтъра.

След филтриране, филтърните хартии внимателно се сгъват и поставят в 15 ml центрофужни епруветки (Фигура 17). Всяка епруветка се пълни с 10 ml 90% разтвор на ацетон, запечатва се и се съхранява в хладилник (приблизително 4°C) за една нощ (около 12–24 часа), за да се улесни екстракцията на хлорофила в разтворителя. Тази стъпка осигурява максимален трансфер на хлорофила от клетките на водораслите в ацетона.



Фигура 17. Центрофужни епруветки

След 24-часовия период на екстракция, епруветките се вадят от хладилника и се оставят да достигнат стайна температура. След това се центрофугират при 5000 rpm за 10 минути, за да се утаят твърдите частици и да се получи бистра супернатантна течност.

Абсорбцията на този бистър супернатант се измерена при 750, 664, 647 и 630 nm с помощта на спектрофотометър. За да се елиминират грешките, дължащи се на мътност (разсейване на светлината от суспендирани частици), абсорбцията при 750 nm се изважда от показанията при 664, 647 и 630 nm. Тази корекция минимизира интерференцията от разсейване на светлината, различно от хлорофил, което води до по-точни измервания на хлорофила (Фигура 18).

Изчисляване на концентрацията на Chl-*α*:

Chl-*α* (μg L^{-1}) = (11.85 * (E664 – E750)-1.54 * (E647 - E750)- 0.08 * (E630-E750))*Ve/Vf

Ve: Обем на екстракцията (ml), Vf: Обем на филтрираната вода (литри)



interreg Co-funded by the European Union
NEXT Black Sea Basin
MACRO CLEAN

Фигура 18. Измервания на хлорофила

II.III. ВЗИМАНЕ НА ПРОБИ ОТ СЕДИМЕНТИ

Пробите от седименти се събират от станции с различна структура на почвата, като се използва седиментна сонда или лопата (Фигура 19). Пробите се събират от горните 0–5 см от повърхността на седиментите, за да се изследват взаимодействията с околната среда. След като бъдат събрани, пробите се етикетират внимателно за идентификация и се съхраняват във фризер при -20°C, за да се запази тяхната цялост до по-нататъшен анализ (Фигура 20).



Фигура 19. Уред за вземане на проби от седименти

За да се гарантира точността и чувствителността на анализите на метали, пробите от седименти се съхраняват в киселинна среда. Към всяка проба се добавя малко количество (1-2 ml) концентрирана HNO_3,

за да се предотврати утаяването на метали и да се запази тяхната разтворимост. Тази стъпка е от решаващо значение за точното измерване на следи от метали, особено при работа със сложни седиментни матрици. След като бъдат обработени с киселина, пробите се съхраняват при ниски температури, обикновено около 4°C, докато са готови за транспортиране до лабораторията за по-нататъшна обработка



Фигура 20. Етикетирани проби от седименти

При пристигането си в лабораторията, пробите от седиментите се разтварят с помощта на киселинни разтворители, като концентрирана HNO_3 или HCl, за да се разгради седиментът и да се освободят съдържащите се в него метали. Този процес гарантира, че съдържанието на метал е напълно извлечено за анализ. След това разтворените проби се анализират за концентрации на следи от метали. Анализът се провежда с помощта на масспектрометър с индуктивно свързана плазма (ICP-MS) или атомно-абсорбционна спектроскопия (AAS), като и двете са високоефективни техники за

interreg Co-funded by the European Union
NEXT Black Sea Basin
MACRO CLEAN

откриване и количествено определяне на следи от метали в проби от околната среда.

ЧАСТ III- АНАЛИТИЧНИ ТЕХНИКИ

III.I. АНАЛИЗ НА МЕТАЛИ В МАКРОВОДОРАСЛИ

Процесът на анализ на метали в макроводорасли започва със събиране на проби от избрани места, където макроводораслите са в изобилие. След събирането им, пробите от макроводорасли се почистват внимателно, за да се отстранят морска вода, отломки и други замърсители, които биха могли да повлияят на анализа. Този процес на почистване е от решаващо значение, за да се гарантира, че външни материали не влияят на резултатите.

След почистване, макроводораслите се сушат в пещ. Този процес на сушене премахва съдържанието на влага. След като водораслите са напълно изсушени, те се смилат на фин прах. Обикновено от 0.5 до 1 грам от изсушените и смлени макроводорасли се използва за анализ на метали.

След това смлените водорасли се подлагат на киселинен процес на разграждане. Пробата се разтваря в концентрирана HNO_3 или HCl, за да се разгради органичният материал и да се освободят съдържащите се в него метали. След разграждането разтворът се филтрира, за да се отстранят евентуално останалите твърди остатъци.

След това филтрираният разтвор се разрежда до подходящата концентрация и се подготвя за анализ на метали. Ако пробите от макроводорасли трябва да се съхраняват преди анализа, те се съхраняват в подкиселен разтвор и се охлаждат при 4°C, за да се запази тяхната цялостност, докато са готови за тестване.

III.II. АНАЛИЗ НА МЕТАЛИ В МОРСКА ВОДА

interreg Co-funded by the European Union
NEXT Black Sea Basin
MACRO CLEAN

Анализът на метали в морската вода започва със събиране на проби от морска вода от избрани места, особено там, където се срещат макроводорасли. Пробите от морска вода се събират в контейнери от 250 куб. см, които са запечатани, за да се избегне замърсяване или загуба на летливи вещества по време на транспортиране. След като бъдат събрани, пробите от морска вода се съхраняват при стайна температура, далеч от пряка слънчева светлина и топлина, за да се запази тяхната цялост, докато са готови за анализ. За анализ на метали към всяка проба се добавя 1 мл концентрирана HNO_3, за да се предотврати утаяването на метали и да се гарантира, че пробата остава в разтворено състояние (Фигура 21). Подкиселените проби се съхраняват в запечатан контейнер, докато бъдат транспортирани до лабораторията за по-нататъшен анализ. В лабораторията пробите от морска вода се анализират за концентрации на следи от метали.

interreg Co-funded by the European Union
NEXT Black Sea Basin
MACRO CLEAN



Фигура 21. Добавяне на концентрирана HNO_3 към пробите от морска вода

III.III. АНАЛИЗ НА МЕТАЛИ В СЕДИМЕНТИТЕ

Пробите от седименти, взети от района, където се събират макроводорасли, се вземат от горния 0-5 см слой на повърхността на седимента. След събирането им, към пробите се добавят 1-2 мл азотна киселина, те се етикетират и съхраняват при -20°C, за да се запази тяхната цялост до по-нататъшен анализ.

interreg Co-funded by the European Union NEXT Black Sea Basin MACRO CLEAN

Преди анализ на метали, пробите от седименти се изваждат от фризера и влагата се отстранява с помощта на попивателна хартия. След това се сушат в пещ при 105°C в продължение на 24 часа. След изсушаване пробите от седименти се прекарват през моторизирана ситова машина с различни размери на отворите, като частици с размер 63 μm или по-малки се използват за определяне на концентрациите на елементи (Фигура 22).

Малките проби, предназначени за анализ на метали, след това се изгарят в микровълнова инсталация за разграждане, след което се анализират с помощта на ICP-MS или AAS устройства (Фигура 23).



Фигура 22. Пресяване на проби от сухи седименти с помощта на моторизирана ситова машина



Фигура 23. Микровълнов агрегат за разграждане

ЧАСТ IV- ОРАНЖЕРИЯ

IV.I. ИЗГРАЖДАНЕ НА ОРАНЖЕРИЯ

Оранжерията е проектирана да бъде с минимална площ от 50 кв. м (5.5 м x 9.09 м) и е затворена (Фигура 24 и Фигура 25 за Университета в Синоп) и (Фигура 26 за Университета в Шумен). Размерите на

оранжерията са 5.5 м x 9.09 м, с обща площ от 50 м². Минималната височина в центъра е 270 см. Тя разполага с две плъзгащи се врати, всяка с минимална ширина 1 м, оборудвани с вентилационни решетки (снабдени с мрежи против комари, отваряеми и затварящи се, метални, минимален размер 45x45 см).



Фигура 24. Визуално представяне на оранжерията, която ще се използва в изследването



Фигура 25. Монтаж на оранжерията в SNU

interreg Co-funded by the European Union
NEXT Black Sea Basin
MACRO CLEAN



Фигура 26. Монтаж на оранжерията в ШУ

Конструкцията на оранжерията е изградена от поцинковани тръби. Основните опорни стълбове, които се забиват в земята във всяка точка на свързване на пружините, са изработени от поцинкована тръба с диаметър 40 мм, докато стълбовете на дъгата са изработени от поцинкована тръба с диаметър 32 мм. Заземяващите връзки са разположени на подходящо разстояние, за да се осигури устойчивост на вятър.

По страничните и горните повърхности на оранжерията са монтирани три реда поцинкована тръба с диаметър 32 мм и пет реда равномерно разположена поцинкована тел (с минимална дебелина 2 мм), както е показано на илюстрацията.

Оранжерията има две врати (отпред и отзад), изработени от метални профили и покрити с найлоново фолио. За да се увеличи структурната стабилност, се използват две вертикални опорни тръби и ножично укрепени тръби с кръстосани скоби, свързани с хоризонтална горна тръба. Покритието на оранжерията е положено и закрепено здраво, за да се предотврати повреда от вятъра, като краищата са заровени в

interreg Co-funded by the European Union
NEXT Black Sea Basin
MACRO CLEAN

почвата. Поцинкованите тръби имат дебелина на стената не по-малка от 2.5 мм.

Пластмасовото покритие (фолио за оранжерия) е 36-месечен издръжлив полиетиленов материал с UV, IR, EVA, AO, AV и дифузионно-устойчиви свойства.

IV.II. РАСТЕНИЯ В ОРАНЖЕРИЯ

Растенията се култивират както в саксии, така и директно в почвата вътре в оранжерията. След завършване на първия и втория опитен период, саксиите се преместват в почвената зона в оранжерията. Тази стратегия позволява по-ефективно използване на пространството на оранжерията (Фигура 27 и Фигура 28). Анализираната почва се поставя в саксиите преди засаждане.

Проучването има за цел да приложи течен тор, твърд тор (както под формата на прах, така и на гранули) и компост в три различни концентрации: 1 g, 3 g, 5 g (за твърди вещества) и 1 ml, 3 ml, 5 ml (за течности).

Освен това, 2 саксии се използват за химически торове, а 2 саксии служат като контрола във всеки опитен период. Следователно, за всеки растителен вид са необходими общо 14 саксии за всеки период.



interreg NEXT Black Sea Basin Co-funded by the European Union MACRO CLEAN



Фигура 27. Планове за разположение на саксиите и растенията в оранжерията (първи и втори период)



Фигура 28. Планове за разположение на саксиите и растенията в оранжерията (трети и четвърти период)

Разпределение на саксиите на растение (за пробен период)

- Течен тор: 3 саксии (1 мл, 3 мл, 5 мл)
- Твърд тор (прах): 3 саксии (1 г, 3 г, 5 г)
- Твърд тор (гранули): 1 саксия (3 г)
- Компост: 3 саксии (1 г, 3 г, 5 г)
- Контролен и химически тор: 4 саксии

interreg Co-funded by the European Union
NEXT Black Sea Basin
MACRO CLEAN

- Общо: 14 саксии на растителен вид за период

IV.III. ИЗПИТВАНИЯ ЗА РАСТЕЖ НА РАСТЕНИЯ

Изпитванията за растеж на растения се провеждат на два етапа: опити в саксии и опити в оранжерии. При опитите в саксии се провеждат контролирани експерименти с растения в саксии, за да се изследва влиянието на торове на базата на макроводорасли върху растежа на растенията, добива и усвояването на хранителни вещества. Тези опити предоставят подробна информация при стандартизирани условия. При опитите в оранжерии се провеждат полуполеви експерименти при по-естествени условия, което позволява оценка на ефективността на тора в по-голям мащаб.

Саксията е от тип вила и има правоъгълна форма, с минимален капацитет от 62 литра (размери: 38 x 86 x 30 см). Материалът е устойчив на UV лъчи и е подходящ за употреба на открито. Всяка саксия има дренажен отвор и основа на дъното.

ЧАСТ V - РАСТИТЕЛНИ МАТЕРИАЛИ

В този изследователски проект, ягода (*Fragaria* × *ananassa*) и маруля (*Lactuca sativa L.*) са избрани като представителни растителни материали.

Ягодата е широко култивиран хибриден вид от *р. Fragaria* от *сем. Розоцветни (Rosaceae)*, отглеждан в световен мащаб заради плодовете си. Опитният сорт е избран заради широката си екологична адаптивност и краткия период на плододаване. Разсадът от ягоди, който ще се засажда в саксии, се доставя като растения с голи корени, подрязани така, че да имат два или три листа и дължина на корените приблизително 10 см (Фигура 29).

Марулята (*Lactuca sativa L.*) е едногодишно растение, принадлежащо към сем. Сложноцветни (*Asteraceae*) (Фигура 30). Този сорт е селектиран

interreg Co-funded by the European Union
NEXT Black Sea Basin
MACRO CLEAN

заради способността си да расте целогодишно и краткия си цикъл на прибиране на реколтата. Първоначално семената на марулята покълват в саксии. След като разсадът развие 2–3 листа, той се пресажда в саксии. Съответните измервания се извършват по време на периода на растеж на растението.



Фигура 29. Ягода (*Fragaria x ananassa*) и разсад от ягоди



Фигура 30. Маруля (*Lactuca sativa L.*)

V.I. ПРОИЗВОДИТЕЛНОСТ НА ЗЕЛЕНЧУЦИТЕ

Производителността на зеленчуците, отглеждани с торове на базата на макроводорасли, се оценява чрез няколко ключови параметъра. Първо, растежът на културите, добива и качествените характеристики се измерват и сравняват с тези на зеленчуците, отглеждани с

interreg NEXT Black Sea Basin Co-funded by the European Union MACRO CLEAN

конвенционални торове. Това помага да се определи ефективността на торовете на базата на макроводорасли за подпомагане на развитието на растенията. Освен това се анализира хранителното съдържание на реколтираните зеленчуци, за да се оцени колко ефективно растенията могат да усвояват хранителни вещества от тези органични торове. Накрая се провежда анализ на остатъците, за да се открият потенциални замърсители или остатъци в зеленчуците, които могат да са резултат от прилагането на торове на базата на макроводорасли.

V.II. РАСТИТЕЛНИ АНАЛИЗИ

Проучването включва подробни анализи на растежа на растенията, усвояването на хранителни вещества и нивата на остатъци в ягодови и марулеви растения.

a. Растеж и добив на културите: За да се оцени растежът и добива, се извършват различни измервания и наблюдения върху поне пет проби за всяка третирана група. Те включват: височина на растението (над земята), ширина и дължина на листата, брой цветове (за ягоди), брой плодове (за ягоди), цвят на тялото на растението и листата, обща дължина на растението, включително корените, тегло на растението след изваждане от почвата, както и сензорни оценки като цвят, вкус и мирис. За марулята се измерва и диаметърът.

b. Усвояване на хранителни вещества: Анализът на хранителните вещества се извършва чрез вземане на проби от листата по време на средния растеж. Анализират се следните елементи: азот (N), фосфор (P), калий (K), калций (Ca), магнезий (Mg), желязо (Fe), мед (Cu), манган (Mn) и цинк (Zn).

За ягодите оптималния период за вземане на проби е по време на активен растеж, преди цъфтеж и плододаване. Около 10–15 листа (100–150 g) се събират на случаен принцип от различни части на различни растения. Пробите се транспортират при условия на студена верига.

interreg Co-funded by the European Union
NEXT Black Sea Basin
MACRO CLEAN

За марулята пробите от листа се събират 2–4 седмици преди прибиране на реколтата. Отново 10–15 листа (100–150 g) се вземат от различни части на растенията и се транспортират при условия на студена верига.

с. Анализ на остатъци: Анализът на остатъци от тежки метали се извършва, за да се открие наличието на метали като Cu, Hg, Zn, Fe, Ca и др.

При ягодите вземането на проби се извършва 3–7 дни преди прибиране на реколтата, когато е най-вероятно тежките метали да се натрупат в листата. Приблизително 10–15 горни листа се вземат проби на случаен принцип и се съхраняват при условия на студена верига, като се използват хигиенични материали за съхранение, като например кутии за лед и защитни опаковки.

При марулята пробите се събират 2–4 седмици преди прибиране на реколтата, когато се очаква усвояването на метали да е най-високо. Събират се 10–15 листа от различни части на множество растения, общо около 100–150 грама. Тези проби също се съхраняват при строги протоколи за студена верига и хигиена.

ЧАСТ VI – ПОЧВОВИ МАТЕРИАЛИ

Анализът на почвата в проекта се фокусира върху оценката на почвеното плодородие и микробната активност чрез анализ на съдържанието на хранителни вещества и pH преди и след прилагане на торове на базата на макроводорасли. Той също така оценява въздействието на тези торове върху микробните съобщества и кръговрата на хранителните вещества, предлагайки информация за тяхното влияние върху здравето на почвата.

interreg Co-funded by the European Union
NEXT Black Sea Basin
MACRO CLEAN

VI.I. ПОЧВЕН МАТЕРИАЛ И АНАЛИЗ

Почвата, която ще се използва в експеримента, се набавя от района около оранжерията, създадена за проекта (Фигура 31). Преди засаждане почвата се подготвя чрез прекарване през сито с размери 1 см, за да се отстранят всички големи частици. Проби от почвата се събират както преди поставянето на почвата в саксиите, така и след като растенията са завършили растежа си. По подобен начин се извършва анализ на почвата както преди, така и след засаждането на растенията, отглеждани в оранжерийната почва.



Фигура 31. Почвен материал в оранжерия

Оценка на почвеното плодородие: Почвеното плодородие се оценява чрез анализ на съдържанието на хранителни вещества и pH преди и след прилагане на торове на базата на макроводорасли. Проби (близо 1000 грама) се вземат от дълбочина 0–20 см, както преди засаждане, така и след развитието на растенията. pH се измерва с pH-метър и се

interreg Co-funded by the European Union
NEXT Black Sea Basin
MACRO CLEAN

извършва анализ на органичната материя, за да се оцени хранителният статус на почвата.

Микробна активност в почвата: Оценява се въздействието на торовете на базата на макроводорасли върху почвените микробни съобщества и кръговрата на хранителните вещества. Увеличението на общата микробна маса показва увеличение на микроорганизмите, тяхната биологична активност или подобрени условия на околната среда за тях. Това увеличение обикновено има положителен ефект върху селскостопанската производителност, екологичното здраве и функционирането на екосистемата. Анализите на микробната активност се провеждат за всяка група във всеки период, както преди, така и след експеримента.

VI.II. НАПОЯВАНЕ НА РАСТЕНИЯ

Напояването се извършва с градска вода. Автоматична напоителна система, свързана към изходната линия на резервоара за вода, разположен извън оранжерията, осигурява поливане в зависимост от климатичните условия. Честотата на поливане се определя според нивата на електропроводимост (EC) (Ягоди: 1–2.5; Маруля: 1.5–3), а средното pH се поддържа около 6.

ЧАСТ VII - ТОРОВЕ

За изследването се приготвят три различни вида торове: течен тор, компост и твърд тор. След приготвяне, торовете се анализират преди прилагането им върху растителните проби.

VII.I. ТЕЧЕН ТОР

Събраните макроводорасли (*Ulva* spp.) се накисват в чешмяна вода при температура +40°C за 24 часа, преди да се пристъпи към изследвания за производство на торове. Макроводораслите се измиват с течаща чешмяна вода, докато нивото на соленост падне под 1 PSU. След като се достигнат желаните стойности, процесът на измиване се прекратява и се започва следващият етап.

interreg Co-funded by the European Union NEXT Black Sea Basin | MACRO CLEAN

Пробите, подготвени с размер 0.5–1 cm след извличане от морето и предварителна обработка, ще бъдат смесени с чиста вода в съотношение 1:1 и поставени във ферментационен резервоар (Фигура 32). Резервоарът за тор, който ще се използва, не е бил използван преди това. Използват се прости механизми, като например пластмасови контейнери. Поради това ще бъдат направени малки модификации на съществуващите ферментационни резервоари, включително инсталиране на заключващ механизъм за предотвратяване на проникване на въздух.

Температурата във ферментационния резервоар ще се поддържа между 22–26°C, а pH трябва да бъде 7. pH ще се следи от специално отделение в резервоара. Ако е необходимо, може да се добави киселина, като KOH, за да се регулира pH. За прецизни корекции на pH може да се консултирате с химик. Миксерът във ферментационния резервоар ще работи по 2 минути на всеки 15 минути. Периодът на ферментация ще продължи 30 дни.

След като ферментацията приключи, течният тор ще се прехвърли в бутилки и ще се смеси с чиста вода в съотношение 1:5 (1 част тор към 5 части вода). За да се спре процесът на ферментация, в бутилките ще се добави натриев метабисулфит (E223) (5.5 g/20 L), заедно с калиев метабисулфит (2 g/10 L) като инхибитор на мухъл и гъбички. За почистване на ферментационния резервоар ще се използва смес от калиев метабисулфит (20 g/10 L) и лимонена киселина (10 g/10 L) за дезинфекция. Сместа ще се излее в резервоара за ферментация, а капакът ще бъде леко затворен, за да може газовете да излизат бавно. След 30 минути изчакване, разтворът ще се източи без необходимост от изплакване.

interreg Co-funded by the European Union
NEXT Black Sea Basin
MACRO CLEAN



Фигура 32. Резервоар за течен тор

Течният тор се прилага в три различни концентрации (1 мл, 2 мл и 3 мл). Първото приложение се прави веднага след засаждането на растенията в саксии или почва. Последващите приложения се извършват на интервали от 15 дни, докато растенията завършат развитието си. При всяко приложение течният тор се добавя към 1 литър вода в посочените концентрации (1 мл, 2 мл и 3 мл) и се прилага както в саксиите, така и в откритата почва.

interreg Co-funded by the European Union
NEXT Black Sea Basin
MACRO CLEAN

VII.II. ТВЪРД ТОР

След като бъдат събрани от морето, пробите преминават през предварителна обработка, започваща с процес на сушене, за да се намали съдържанието на влага до под 10%. (Фигура 33). След това се смилат на прах с помощта на мелница. От получения прах се произвеждат торове под формата на пелети с диаметър 2.5 мм и 3 мм. Както прахообразният тор, така и пелетите се пречистват отделно.



Фигура 33. Процес на сушене в климатизирана камера

Interreg Co-funded by the European Union
NEXT Black Sea Basin
MACRO CLEAN

Приложенията се правят след приключване на анализа. Пропионова киселина (95%) се използва като инхибитор на мухъл и гъбички за твърдия тор. След пръскане торът се съхранява в затворен контейнер за 1 ден. След това капакът на контейнера се отваря за още 1 ден и торът е готов за употреба. За 1 кг твърд тор се използва смес от 20 мл вода и 3 мл пропионова киселина.

Прилагането на твърд тор започва непосредствено преди засаждането. С други думи, първо се прилага торът, а след това растението се засажда. След прилагане на прахообразния тор, почвата се разбърква на дълбочина 10 см. Торът се прилага на интервали от 15 дни, докато растението завърши развитието си. В контролната саксия не се прилага тор. Втората саксия получава 1 гр тор, третата саксия получава 3 гр, а четвъртата саксия получава 5 гр като начална доза. При прилагане на гранули почвата се разбърква на дълбочина 3-5 см от повърхността. Гранулата се прилага като еднократна доза в 1 саксия и се смесва с почвата. Количеството за приложение на гранулата е 3 гр. Твърдите торове се прилагат директно в кореновите области на растението.

VII.III. КОМПОСТЕН ТОР

След като бъдат събрани от морето и преминат предварителна обработка, пробите се нарязват на парчета с размер 1–3 см (Фигура 34) и след това се поставят в устройство за ферментация (Фигура 35), за да се приготви компост по метода „Бокаши“. Приготвеният компост се прилага върху растенията след анализ.

Пропионова киселина (95%) се използва като инхибитор на мухъл и гъбички в компоста. След прилагане чрез пръскане, компостът се съхранява в затворен контейнер за 1 ден. След това капакът на контейнера се отваря за още 1 ден, за да се позволи на компоста да се проветри, което го прави готов за употреба. Компостните торове се прилагат веднага след засаждането. След това торът се прилага на интервали от 15 дни, докато растението завърши развитието си. В контролната саксия не се прилага тор. Втората саксия получава

interreg Co-funded by the European Union
NEXT Black Sea Basin
MACRO CLEAN

начална доза от 1 гр, третата саксия получава 3 гр, а четвъртата саксия получава 5 гр тор.



Фигура 34. Проби от нарязани макроводорасли.



Фигура 35. Устройство за ферментация.

VII.IV. АНАЛИЗ НА ТОРОВЕ

Преди торовете да бъдат приложени към растителните проби, те преминават през щателен анализ. Анализът оценява различни параметри както за течни, така и за твърди торове, както и за компост.

За течните и твърдите торове се изследват следните параметри: съдържание на влага, загуба при горене, pH, електрическа проводимост (EC) и нивата на основни хранителни вещества като азот (N), фосфор (P), калий (K), калций (Ca), магнезий (Mg), желязо (Fe), манган (Mn), цинк (Zn) и мед (Cu). Освен това се анализира и наличието на алгинова киселина, гиберелинова киселина, цитокинин и ауксин.

interreg Co-funded by the European Union
NEXT Black Sea Basin
MACRO CLEAN

За компоста анализът включва съдържание на влага, загуба при горене, pH, EC и същите основни хранителни вещества (N, P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, Cu). Освен това се изследват хуминова киселина и фулвинова киселина, заедно с алгинова киселина, гиберелинова киселина, цитокинин и ауксин.

VII.V. ПРИЛОЖЕНИЕ НА ХИМИЧЕСКИ ТОРОВЕ (15N, 15P, 15K)

В допълнение към торовете на базата на макроводорасли, по време на изследването върху всяко растение се прилагат и химически торове. Използваният химически тор е със състав 15-15-15 (15% азот, 15% фосфор и 15% калий).

За ягодите, 30 гр химически тор се прилагат в саксията или почвата непосредствено преди засаждане. Почвата се прекопава на дълбочина 10 см, за да се засадят ягодите. След това, 15 гр химически тор се прилагат на всеки 30 дни, докато проучването приключи.

За марулята, 25 гр химически тор се прилагат веднага след засаждането. Впоследствие, 15 гр тор се прилагат на всеки 15 дни, докато растенията маруля се развият напълно.

ЧАСТ VIII – БИОПЛАСТМАСИ

VIII.I. ПРОЦЕДУРА ЗА ЕКСТРАКЦИЯ

Биомасата с размер между 1–5 мм се вари с дестилирана вода в колба за кипене, използвайки електрически нагревател, в продължение на 30 минути. Остатъкът от водорасли се вари 30 минути в разтвор на $CaCl_2$ (0.5% W/V) в колба за кипене, използвайки електрически нагревател. След това към биомасата от водорасли се добавя натриев хлорид (0.5% W/V) и се вари 60 минути. Накрая остатъкът от водорасли се вари с Na_2CO_3 (5% W/V) в продължение на 30 минути при енергично разбъркване. Натриевият алгинат се получава чрез добавяне на

interreg Co-funded by the European Union
NEXT Black Sea Basin
MACRO CLEAN

изопропилов или етилов алкохол, последвано от сушене в електрическа фурна при 50°C в продължение на 28 часа.

VIII.II. ПРИГОТВЯНЕ НА БИОФИЛМ

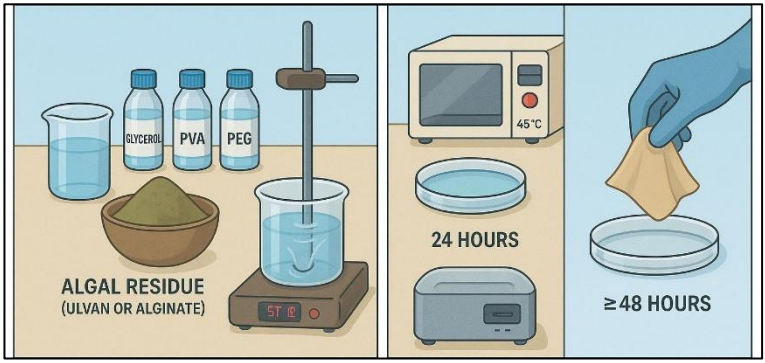
Приготвянето на биофилми започва с точно измерване на различни количества остатъци от водорасли, по-специално улван или алгинат, в зависимост от желаните свойства на филма. Тези биополимери служат като основни суровини и първоначално се разтварят в дестилирана вода, за да се създаде еднороден (хомогенен) разтвор. За да се подобри гъвкавостта, механичната якост и цялостната производителност на биофилмите, в разтвора се добавят различни пластификатори като глицерол, поливинилов алкохол (PVA), полиетиленгликол (PEG) или други полимери, често срещани в литературата – като целулозни производни – в предварително определени концентрации.

Сместа се подлага на непрекъснато разбъркване с помощта на магнитна или механична бъркалка, за да се осигури пълно диспергиране на всички компоненти и да се предотврати агрегирането на полимерните вериги. Разбъркването се извършва при контролирани температури, които могат да варират в зависимост от специфичния протокол, но обикновено варират от стайна температура до умерено нагряване, което улеснява пълното разтваряне и хомогенизиране на разтвора.

След тази стъпка на хомогенизиране, приготвеният разтвор внимателно се излива или отлива върху чисти петриеви панички, за да се образува равномерен слой, който служи като матрица за биофилма. След това тези петриеви панички се поставят в сушилня, поддържана на 45°C, където разтворителят (водата) постепенно се изпарява в продължение на 24 часа. Този процес на сушене води до образуването на тънки, равномерни биофилми, прилепнали към повърхността на паничките.

interreg Co-funded by the European Union
NEXT Black Sea Basin
MACRO CLEAN

След като филмите изсъхнат напълно, те се отлепват внимателно от петриевите панички, за да се избегне повреда или разкъсване. За да се стабилизират физичните свойства и да се отстрани остатъчната влага, биофилмите се кондиционират в продължение на минимум 48 часа в контролирана среда с постоянна температура и относителна влажност. Тази стъпка на кондициониране е от решаващо значение за осигуряване на възпроизводимост и надеждност на характеристиките на биофилма по време на последващо тестване или приложение (Фигура 36).



Фигура 36. Приготвяне на биофилм

VIII.III. ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ФИЛМИТЕ

Характеризирането и оценката на произведените биопластмаси ще се проведат чрез серия от строги тестове, предназначени да оценят цялостно техните физични, оптични, механични, морфологични, термични и биоразградими свойства.

Тези анализи са от решаващо значение не само за определяне на общото качество и характеристики на произведените биопластмаси на базата на морски водорасли, но и за да се даде възможност за директни сравнения с конвенционалните пластмаси, получени от петрол. По този начин проучването има за цел да демонстрира

interreg NEXT Black Sea Basin Co-funded by the European Union MACRO CLEAN

техническата осъществимост и екологичните предимства на производството на биопластмаси от устойчива морска биомаса, като подчертава потенциалния им принос към разрастващия се пазар на зелени технологии.

Физически свойства: Измерват се ключови физични параметри, за да се разбере структурната цялост и екологичната издръжливост на фолиата. Дебелината се оценява с помощта на прецизни микрометри или дебеломери, за да се осигури еднородност. Тестовете за разтворимост изследват устойчивостта на фолиото на вода и други разтворители, което показва неговата пригодност за различни приложения. Измерванията на паропропускливостта (WVP) и скоростта на пренос на водни пари (WVTR) се провеждат, за да се определят бариерните свойства на фолиото срещу пренос на влага; тези свойства са особено важни за опаковъчните приложения. Анализът на съдържанието на влага измерва количеството вода, задържано в биопластмаса, което се счита за важен параметър, влияещ върху неговите механични и бариерни свойства.

Оптични свойства: Визуалното качество и характеристиките на взаимодействие със светлина на филмите се изследват чрез измерване на стойностите на прозрачност, непрозрачност и пропускливост на светлината при съответните дължини на вълните, използвайки спектрофотометрия. Тези свойства са важни за приложения, които изискват специфична оптична яснота или способности за блокиране на светлината, като например опаковки за храни или селскостопански филми.

Механични свойства: Механичните изпитвания се провеждат с помощта на универсална изпитвателна машина за определяне на якостта на опън, удължението при скъсване и модула на Юнг на филмите. Якостта на опън показва максималното напрежение, което биопластичното фолио може да издържи преди скъсване, удължението при скъсване измерва гъвкавостта и пластичността на фолиото, а модулът на Юнг отразява неговата твърдост и еластичност. Тези параметри са от решаващо значение за оценка на

interreg Co-funded by the European Union
NEXT Black Sea Basin
MACRO CLEAN

издръжливостта и характеристиките на биопластмасите в практически приложения.

Морфологично изследване: Използват се усъвършенствани аналитични техники за изследване на химичния състав и повърхностната морфология на биопластмасите. Използва се инфрачервена спектроскопия с Фурие-трансформация (FTIR) за идентифициране на функционални групи и химични връзки, предоставяйки информация за молекулярната структура и взаимодействията във филма. Сканиращата електронна микроскопия с полева емисия (FE-SEM) разкрива подробна топография на повърхността и микроструктурни характеристики, докато атомно-силовата микроскопия (AFM) предоставя информация за наномащабната грапавост на повърхността и текстурата. Рентгенова дифракционна (XRD) оценка се извършва за определяне на кристалността и фазовия състав на биопластичните материали, които влияят върху тяхното механично и термично поведение.

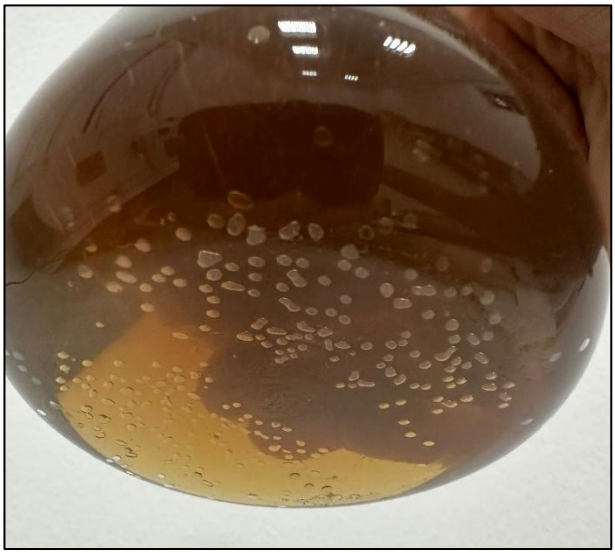
Термични свойства: Извършва се термичен гравиметричен анализ (TGA), за да се оцени термичната стабилност и моделите на разлагане на биопластмасите. Тази техника измерва загубата на тегло като функция на температурата, предоставяйки ценни данни за температурните диапазони, в които биопластмасите запазват своята цялост, и за естеството на процесите на термично разграждане.

Биоразградимост: Въздействието върху околната среда и устойчивостта на биопластмасите се оценяват чрез тестове за заравяне в почвата, при които пробите се заравят в естествена почвена среда и се наблюдават с течение на времето за разграждане. Този тест предоставя емпирични доказателства за скоростта на биоразграждане и степента, до която биопластмасовите материали могат да бъдат разградени от микробна активност, което подкрепя класификацията им като екологични алтернативи на синтетичните пластмаси.

VIII.IV. МЕТОД НА ЕКСТРАКЦИЯ

Екстракция с алгинат

Смачкана в блендер биомаса от водорасли (20 g) се смесва с 200 mL дестилирана вода в чаша и се нагрява при 50°C за 30 минути. Сместа се филтрира и останалият остатък от водорасли се третира с 300 mL разтвор на калциев хлорид (0.5%, w/v) при 50°C за 30 минути. След филтриране се добавят 300 mL разтвор на натриев хлорид (0.5%, w/v) и сместа се нагрява при 50°C за 60 минути. Суспензията се филтрира отново и остатъкът от водорасли се третира със 100 mL разтвор на натриев карбонат (5%, w/v) при 50°C за 30 минути при енергично механично разбъркване. Към филтрата се добавя етилов алкохол за утаяване на натриев алгинат и продуктът се суши в електрическа фурна при 50°C за 28 часа (Фигура 37).



Фигура 37. Екстракция на алгинат

Предварителна обработка за екстракция на улван

interreg Co-funded by the European Union NEXT Black Sea Basin MACRO CLEAN

Улванът се екстрахира от зелени водорасли, използвайки метода на екстракция с гореща вода. Преди екстракцията се извършва предварителна обработка за отстраняване на липиди, пигменти и нискомолекулни съединения, като феноли, свободни захари и аминокиселини. Измитите и изсушени, пасирани в блендер водорасли се третират с етилов алкохол, използвайки екстрактор на Сокслет, в продължение на 24 часа. Супернатантите се изхвърлят и пробите се сушат отново при 40°C в продължение на 48 часа, преди да се съхраняват за процеса на екстракция с гореща вода.

ИНСТРУМЕНТИ И ОБОРУДВАНЕ

AAS (Атомно-абсорбционна спектрофотометрия): Използва се за анализ на концентрациите на метали.
ICP-MS (масспектрометрия с индуктивно свързана плазма): Използва се за анализ на концентрациите на метали.
Автоматична напоителна система: Регулира водоснабдяването на културите.
Аналитичен баланс: Използва се за измерване на проби.
Атомно-силова микроскопия (ACM): Използва се за анализ на повърхностните свойства на биофилми в наномащаб.
Везни: За измерване на теглото на растенията след изваждане от почвата.
Вертикални опорни тръби и кръстосано укрепени тръби: Използват се за повишаване на структурната стабилност на оранжерията.
Дестилирана вода: Използва се за изплакване на събраните проби за отстраняване на чужди материали.
Екстрактор на Сокслет за екстракция с разтворител
Електрически нагревател: Използва се за осигуряване на топлина към кипящата колба.
Запечатани контейнери: Използват се за съхранение на проби от подкиселена морска вода по време на транспортиране до лабораторията.
Изопропилов алкохол или етилов алкохол: Използва се за получаване на натриев алгинат от остатъци от водорасли.

interreg Co-funded by the European Union
NEXT Black Sea Basin
MACRO CLEAN

Инструменти за вземане на почвени проби: Инструменти за събиране на почвени проби преди и след растежа на растенията.
Инструменти за измерване на електрохимична активност: Инструменти, използвани за определяне на нивата на електрохимична активност за регулиране на честотата на напояване.
Инструменти за сензорна оценка: За оценка на цвета, вкуса и миризмата на зеленчуците.
Инфрачервена спектроскопия с Фурие-трансформация (FTIR): Използва се за анализ на химическата структура на произведените биопластмаси.
Квадрат: Използва се за определяне на зоната за вземане на проби от макроводорасли.
Колба за варене: Използва се за варене на биомаса от водорасли по време на обработка.
Контейнери за събиране на морска вода: Използват се за събиране на проби от морска вода.
Контейнери за събиране и транспортиране на проби: Използват се за осигуряване на правилно съхранение и консервация по време на транспортиране.
Концентрирана HNO_3 (азотна киселина): Използва се за подкиселяване на проби за предотвратяване на утаяването на метали и запазване на целостта на пробата.
Метални профили за врати: Използват се за създаване на рамките за вратите на оранжерията.
Микровълнов апарат за разграждане: Използва се за разграждане на проби чрез прилагане на топлина и налягане за разграждане на органичния материал и освобождаване на метали за анализ.
Микроскоп: Използва се за идентифициране на видове макроводорасли чрез микроскопско изследване.
Многопараметрично устройство: Използва се за измерване на in-situ физични параметри като pH, температура, соленост и разтворен кислород.
Моторизирано сито: Използва се за пресяване на изсушени проби от седименти.
Натриев хлорид (0.5% W/V): Използва се за третиране на биомаса от водорасли в процеса на създаване на биофилми и биопластмаси.
Оборудване за пресяване на почвата: За подготовка на почвата преди засаждане чрез отстраняване на големи частици.
Оборудване за съхранение в студена верига: Ледни кутии и хладилен транспорт за поддържане на целостта на пробите.
Оранжерия: Използва се за осигуряване на контролирана среда за растеж на растенията, защитена от външни метеорологични условия.

Пет реда поцинкована тел: Използва се за подсилване на конструкцията на оранжерията.
Петриеви панички: Използва се за разпръскване на хомогенизирани разтвори от остатъци от водорасли и пластификатори за приготвяне на биофилми.
Пластификатори (глицерол, поливинилов алкохол, полиетиленгликол, целулоза): Използва се за приготвяне на биофилми и биопластмаси от остатъци от водорасли.
Пластмасови буркани: Използват се за прехвърляне и съхранение на проби.
Пластмасови торбички: Използва се за временно съхранение на събрани проби по време на транспортиране.
Пластмасово покритие (оранжерийно фолио): Използва се за защита на растенията в оранжерията от UV лъчи и фактори на околната среда.
Плъзгащи се врати: Използват се за осигуряване на лесен достъп до оранжерията и правилна вентилация.
Попивателна хартия: Използва се за изсушаване и отстраняване на излишната вода от почистени проби.
pH-метър: Използва се за измерване на нивото на pH.
Поцинковани тръби: Използват се за изграждане на основната рамка и опорна система на оранжерията, осигурявайки здравина и издръжливост срещу вятърни сили.
Почва: Използва се за осигуряване на среда за растеж на растенията.
Разсад/Семена: Използват се за засаждане.
Разтвор на формалдехид-морска вода (2–5%): Използва се за съхранение на проби от макроводорасли.
Регистратор на данни със сензор за наблюдение на параметрите на околната среда
Резервоар за вода и изходна линия: Източникът на вода за напояване, разположен извън оранжерията, свързан с напоителната система.
Рентгенов дифракционен (XRD) анализ: Използва се за определяне на кристалността и молекулярната структура на биофилмите.
Саксии: Използват се за отглеждане на растения в оранжерията.
Сканиращ електронен микроскоп (SEM): Използва се за изследване на повърхностната морфология на биопластмасите.
Сканиращ електронен микроскоп с полеви емисии (SEM): Използва се за изучаване на повърхностната структура на биофилми.
Спектрофотометър: за анализ на поглъщането или излъчването на светлина от пробите
Термогравиметричен анализатор (TGA): Използва се за анализ на термичната стабилност на произведените биопластмаси.

interreg Co-funded by the European Union
NEXT Black Sea Basin
MACRO CLEAN

Тест за заравяне в почвата: Използва се за оценка на биоразградимостта на биопластмасите.
Ултразвукова вана за екстракция
Филтриращи системи за разделяне на течно и твърдо вещество
Фризер: Използва се за съхранение на проби от седименти, за да се запази тяхната цялост преди анализа.
Фурна: Използва се за сушене на проби.
Хаванче и пестик: Използва се за смилане на изсушени проби от макроводорасли на фин прах за химичен анализ.
Центрофуга за разделяне и утаяване
Шпатула: Използва се за ръчно събиране на макроводорасли от субстрата.

ЛИТЕРАТУРА

Bouiadjra, B. B., Ghellai, M., Daoudi, M., Behmene, I. E., & Bouiadjra, M. E. A. B. (2021). Impacts of the invasive species *Caulerpa cylindracea* Sonder, 1845 on the algae flora of the west coast of Algeria. *Biodiversity Data Journal, 9*, e63617. https://doi.org/10.3897/BDJ.9.e63617

ÇŞB-ÇEDİDGM & TÜBİTAK-MAM. (2017). *Sea Monitoring Guidelines*, Gebze-Kocaeli.

Fernández-Aláez, C., & Fernández-Aláez, M. (2011). Seasonal changes in tissue nutrient concentrations of macroalgae and aquatic angiosperms in Mediterranean ponds (North-Western Spain). *Fundamental and Applied Limnology, 179*(3), 179-192. https://doi.org/10.1127/1863-9135/2011/0179-0179

Setthamongkol, P., Tunkijjanukij, S., Satapornvanit, K., & Salaenoi, J. (2015). Growth and nutrient analysis in marine macroalgae. *Agriculture and Natural Resources, 49*(2), 211-218. https://doi.org/10.1016/j.anres.2015.06.006

Srijaya, T. C., Pradeep, P. J., & Chatterji, A. (2010). Effect of seaweed extract as an organic fertilizer on the growth enhancement of black mustard plant. *Journal of Coastal Research, 1*, 137-150. https://doi.org/10.2112/JCR-SI1-137-150