Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2019, 22 (3), 209-222
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan
ISSN 1311-0489 (Print)
ISSN 2367-8364 (Online)

Сравнително изследване на физични и механични характеристики на биополимерни филми от различни източници

Айтен Солак, Светла Дянкова*, Илиана Начева

Институт по криобиология и хранителни технологии,
1407 гр.София, бул. Черни връх 53, България

Comparative Study of the Physical and Mechanical Properties of Biopolymer Films from Various Sources

Ayten Solak, Svetla Dyankova*, Iliana Nacheva

Institute of Cryobiology and Food Technologies,
1407 Sofia, 53 Cherni Vrah Blvd, Bulgaria
**E-mail: svetla.diankova@ikht.bg*

Original scientific paper

Received: 17.04.2019 *Accepted:* 25.04.2019 *Published:* 05.09.2019

РЕЗЮМЕ

Настоящото изследване е свързано с разработване на технология за получаване на биоразградими едно-компонентни и двукомпонентни филми на основа колаген, желатин, алгинат и пектин. Получените филми са с добри оптични и структурно-механични характеристики. Установените стойности за якост на опън (TS) бяха 3.24 MPa при колагеновите филми и 10.54 MPa при желатиновите филми. Резултатите от изпитването за удължаване при разкъсване (E) варираха от 32.08 % до 173.4%. При алгинатните филми TS бе 18.30 MPa, а E – 78.14 %., докато при пектиновите филми стойностите бяха много по-ниски: TS – 2.21 MPa, а E – 273.3%. При композитните филми получени от смеси алгинат-пектин в съотношение 1:2; 1:1; 2:1 бе наблюдавано значително подобряване на механичните свойства, като най-добри стойнос-

SUMMARY

The present study is related to the development of technology for the production of biodegradable mono-component and two-component films based on collagen, gelatin, alginate and pectin. The obtained films have good optical and structural-mechanical characteristics. The tensile strength (TS) values measured were 3.24 MPa for collagen films and 10.54 MPa for gelatin films. The results of the test for elongation at ultimate strength (E) varied from 32.08% to 173.4%. For alginate films TS was 18.30 MPa and E – 78.14%, while for pectin films the values were much lower: TS – 2.21 MPa and E – 273.3%.

In two-component films made from alginate-pectin mixtures with a ratio of 1:2; 1:1; 2:1, a significant improvement in mechanical properties was observed, with the best values in 1:1 mixtures with TS –

ти бяха наблюдавани при смеси в съотношение 1:1 със стойности на TS – 53.52 MPa и E – 34.4 %.

Крайните продукти от предложената технология представляват добра основа за включване на антимикробни и антиоксидантни вещества от растителен произход или други естествени функционални съставки и могат да бъдат използвани като активни опаковки за хранителната промишленост.

Ключови думи: биополимерни филми, възобновяеми суровини, оптични свойства, механични свойства

53.52 MPa and E – 34.4%.

The final products of the proposed technology provide a good basis for the inclusion of antimicrobial and antioxidant substances of plant origin or other natural functional ingredients and can be used as active packaging for the food industry.

Key words: biopolymer films, renewable raw materials, optical properties, mechanical properties

УВОД

Увеличаването на отпадъците от неразградими синтетични опаковки има негативно влияние върху околната среда и здравето на животните и човека. Поради тези причини много от изследванията се насочват към разработването на нови екологично чисти материали на основата на природни биополимери (протеини, полизахариди и липиди).

Колагенът, желатинът, натриевият алгинат и пектинът са биополимери, които се приемат като безопасни за употреба и се използват в хранителната индустрия като желиращи, сгъстяващи и стабилизиращи агенти. Освен това те са биоразградими; получени от широко разпространени, възобновяеми суровини и притежават добри филмообразуващи качества.

Колагенът е най-разпространеният фибриларен неразтворим протеин в природата. Получава се от кожа, кости, сухожилия и други субпродукти от селскостопански животни. Фибриларната структура на колагена е предпоставка за добрите структурно-механични свойства на получените продукти, което го превръща в подходяща суровина за филми и опаковки за хранително-вкусовата промишленост (Bourtoom, 2008).

Желатинът е частично хидролизиран колаген. Филмите, които образува обикновено са компактни с гладък контур без пори и пукнатини. Бариер-

INTRODUCTION

Increasing waste from non-degradable synthetic packaging has a negative impact on the environment and animal and human health. For this reason, a lot of research is aimed towards the development of new environmentally friendly materials based on natural biopolymers (proteins, polysaccharides and lipids).

Collagen, gelatin, sodium alginate and pectin are biopolymers that are considered safe and are used in the food industry as gelling, thickening and stabilizing agents. They are also biodegradable; obtained from widespread, renewable materials and have good film-forming properties.

Collagen is the most common fibrous insoluble protein in nature. It is obtained from skin, bones, tendons and other animal by-products. The fibrillar structure of collagen is a prerequisite for the good structural and mechanical properties of the resulting products, making it a suitable raw material for films and packaging for the food industry (Bourtoom, 2008).

Gelatin is a partially hydrolysed collagen. The films that are formed with it are usually compact with a smooth contour without pores and cracks. Their

ните им свойства са добри - не пропускат кислород и задържат добре ароматите, но имат висока чувствителност към влага (Ramos et al., 2016).

Алгинатите са полизахариди, получени от различни видове кафяви водорасли. Преставляват неразклонени бинарни кополимери, изградени главно от свързани единици на D-мануронова киселина и нейния изомер L-гулуронова киселина. От солите на алгиновата киселина най-често практическо приложение намира натриевият алгинат. В присъствието на многовалентни катиони (например Ca^{2+}) е способен да образува триизмерни мрежи. Филмите от натриев алгинат са гладки и еластични (Koushki et al., 2015).

Пектините са растителни хетерополизахариди, съдържащи се основно в клетъчната стена на сухоземните растения. Основната верига на пектиновата молекула е изградена от единици D-галактуронова киселина, а страничните вериги съдържат L-арабиноза, L-рамноза, D-ксилоза, D-глюкоза и D-галактоза. В зависимост от степента на естерификация пектините се разделят на две основни категории – високоестерифициран и нискоестерифициран пектин. Поради своята биоразградимост, биосъвместимост, ядливост и филмообразуващи свойства, са подходяща суровина за получаване на биополимерни филми (Espitia et al., 2014).

За подобряване на структурно-механичните и физикохимичните свойства на филмите към биополимерната матрица се включват пластификатори и омрежващи агенти. Пластификаторите, които се използват при разработване на филми трябва да бъдат съвместими с основния матричен компонент, като основно влияние имат молекулната маса, конфигурацията и общият брой функционални групи на пластификатора (Wittaya, 2012). Разрешени за използване в хранително-вкусовата промишленост са полиоли (глицерол, сорбитол, полиетилен гликол), моно- и дизахариди

barrier properties are good - they do not omit oxygen and retain good aroma but have high moisture sensitivity (Ramos et al., 2016).

Alginates are polysaccharides derived from different kinds of brown algae. They are unbranched binary copolymers composed mainly of linked units of D-mannuronic acid and its isomer L-guluronic acid. The most commonly used salt of alginic acid is sodium alginate. In the presence of polyvalent cations (e.g. Ca^{2+}) it is able to form three-dimensional networks. The films, based on sodium alginate are smooth and elastic (Koushki et al., 2015).

Pectins are plant heteropolysaccharides mainly found in the cell wall of terrestrial plants. The basic chain of the pectin molecule is composed of D-galacturonic acid units while the side chains contain L-arabinose, L-rhamnose D-xylose, D-glucose and D-galactose. Depending on the degree of esterification, the pectins are divided into two main categories – high-esterified and low-esterified pectin.

Due to its biodegradability, biocompatibility, edibility and film-forming properties, it is a suitable raw material for making biopolymer films (Espitia et al., 2014).

Plasticizers and crosslinking agents are included to the biopolymer matrix in order to improve the structural-mechanical and physicochemical properties of the film. Plasticizers used in film development should be compatible with the basic matrix component, the most important factors being molecular weight, configuration and total number of functional groups of the plasticizer (Wittaya, 2012). The polyols (glycerol, sorbitol, polyethylene glycol), mono- and disaccharides (sucrose, glucose, fructose) and lipids and their derivatives (monoglycerides, phospholipids and

(сукроза, глюкоза, фруктоза), липиди и техните деривати (моноглицериди, фосфолипиди и сърфактанти).

При процеса омрежване се намалява подвижността в полимерната структура, подобряват се бариерните свойства и се повишава здравината на филма. Омрежващите агенти при протеините и полизахаридите в повечето случаи представляват симетрични бифункционални съединения с реактивни групи, проявяващи специфичност спрямо функционалните групи в макромолекулния матрикс (Azaredo and Waldron, 2016). При алгинатите и пектините, омрежването се осъществява чрез йонно взаимодействие между полиуронати и дивалентни метални йони (Rhim, 2004). Алдехидите (формалдехид, глутаралдехид) са най-често използваните омрежващи агенти при протеиновите филми. Те са сравнително евтини и бързо реагират със свободните непротонирани ε-амино групи в полипептидните вериги. Тяхното използване в материали, които са в контакт с храни, е нежелателно, поради опасения за токсичен ефект на алдехидни остатъци в случаите на тяхна миграция към хранителния продукт (Azaredo and Waldron, 2016). Поради тази причина през последните десетилетия са проведени множество изследвания, свързани с алтернативни омрежващи агенти за приложение в хранително-вкусовата промишленост. Има данни за използване на микробиална трансглутаминаза (De Cavalho and Crosso, 2006), генипин (Bigi et al., 2002), феноли, полифеноли и др. (Araghi et al., 2015).

Целта на настоящето изследване е получаване на нови еднокомпонентни филми на основа колаген, желатин, алгинат и пектин и композитни алгинат-пектинови филми и определяне на техните физични и механични свойства.

surfactants) are authorized for use in the food industry.

In the process of crosslinking, mobility in the polymeric structure is reduced, the barrier properties are improved and the strength of the film is increased. The crosslinking agents of the proteins and the polysaccharides in most cases represent symmetrical bifunctional compounds with reactive groups interacting with specific functional groups in the macromolecular matrix (Azaredo and Waldron, 2016). In alginates and pectins, the crosslinking is carried out by ionic interaction between polyuronates and divalent metal ions (Rhim, 2004).

Aldehydes (formaldehyde, glutaraldehyde) are the most commonly used crosslinking agents in protein films. They are relatively inexpensive and react with the free unprotonated ε-amino groups in the polypeptide chains. Their use in materials, which are in contact with food is undesirable due to concerns about the toxic effect of aldehyde residues in the cases of their migration to the food product (Azaredo and Waldron, 2016).

For this reason, many studies have been carried out over recent decades on alternative cross-linking agents for use in the food industry. There is data for the use of microbial transglutaminase (De Cavalho and Crosso, 2006), genipin (Bigi et al., 2002), phenols, polyphenols etc. (Araghi et al., 2015).

The aim of the present study is to obtain new mono-component films based on collagen, gelatin, alginate and pectin, and composite alginate-pectin films and determining their physical and mechanical properties.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Материали: ябълков пектин (високоестерифициран, степен на естери-

MATERIAL AND METHODS

Materials: apple pectin (high-esterified, degree of esterification 56.90%)

фикация 56.90%) (CpCelso), натриев алгинат (P.I.C.C.O), желатин, 260 Bloom (Алфрост ООД), колаген тип I (произведен в ИКХТ). Всички използвани реактиви и химикали са чза и са закупени от Merck.

Методи:

Получаване на биополимерни филми. Получени са три вида филми чрез метод на разтваряне: 1) протеинови: колаген (*C*), желатин (*G*); 2) полизахаридни: натриев алгинат (*AG)*, пектин (*P*) и 3) композитни: а) натриев алгинат-пектин в съотношение 2:1 (*AG-P_1),* натриев алгинат-пектин в съотношение 1:1 (*AG-P_2)*, натриев алгинат-пектин в съотношение 1:2 (*AG-P_3)*.

Концентрацията на полимерите в разтвора и основните параметри при разтваряне са дадени в Таблица 1.

(CpCelso), sodium alginate (P.I.C.C.O.), gelatin 260 Bloom (ALFROST Ltd), collagen type I (manufactured by ICFT). All reagents and chemicals used were of analytical grade and purchased from Merck.

Methods:

Preparation of biopolymer films. Three types of films were obtained by dissolution method: 1) proteins: collagen (C), gelatin (G); 2) polysaccharides: sodium alginate (AG), pectin (P), and 3) composites: a) sodium alginate – pectin in a ratio 2:1 (AG-P1); b) sodium alginate – pectin in a ratio 1:1 (AG-P2); c) sodium alginate – pectin in a ratio 1:2 (AG-P3).

The concentration of polymers in the solution and the basic dissolution parameters are given in Table 1.

Таблица 1. Състав и режим на получаване на различни видове биополимерни филми

Table 1. Composition and parameters of obtaining the different variants of biopolymer films

Филми Films	Параметри / Parameters					
	Конц. на полимера Conc. of the polymer (%)	Съотношение Proportion	Разтворител Solvent	pH	t°C на разтв./смесване t°C of dissolving/mixing	Омрежващ агент Cross-linking agent
Протеинови Protein						
• Колаген (C) Collagen (C)	2.0	-	Дестилир.вода Distilled water	6.4	20°C	Галотанини Gallotannin
• Желатин (G) Gelatine (G)	10.0	-	40% етанол 40% ethanol	6.5	60°C	Галотанини Gallotannin
Полизахаридни Polysaccharide						
• Алгинат (AG) Alginate (AG)	2.5	-	Дестилир.вода Distilled water	5.2	20°C	$CaCl_2$
• Пектин (P) Pectin (P)	2.5	-	Дестилир.вода Distilled water	2.9	20°C	$CaCl_2$
Композитни Composite						
• $AG-P_1$	2.5	2:1	Дестилир.вода Distilled water	4.7	20°C	$CaCl_2$
• $AG-P_2$	2.5	1:1		3.8	20°C	$CaCl_2$
• $AG-P_3$	2.5	1:2		3.3	20°C	$CaCl_2$

Всички филмообразуващи разтвори (FS) се хомогенизираха при постоянно разбъркване (300-600 rpm), след което скоростта се намаляваше до 100 rpm и се добавяха пластификатор (0.8

All film forming solutions (FS) were homogenized with constant stirring (300-600 rpm), then the rate was reduced to 100 rpm and plasticizer was added (0.8 g/g polymer in gelatin and alginate films

g/g полимер при желатиновите и алгинатните филми и 0.6 g глицерол/g полимер при всички останали) и омрежващ агент (1% 0.1 M разтвор на $CaCl_2$ за филми на основа полизахариди или 1 % галотанини от смрадлика за филми на основа протеини). Приготвените хидроколоидни FS се сонифицираха (10 min на ултразвукова вана, Ultrasonic system, M7652) и третираха под вакуум за отстраняване на въздушните мехурчета. След това филмообразуващите разтвори се отливаха в петри (0.325 g FS/cm^2) и изсушаваха под вакуум (20 kPa, SPT-200 Vacuum Drier) при 35°C. Сухите проби от филми, съдържащи натриев алгинат се поставяха в 0.3 M разтвор на CaCl2 за допълнително омрежване, промиваха се с дестилирана вода за отстраняване на излишния Ca^{2+}, и изсушаваха при 25° C. Преди тестване всички филми се съхраняваха при стайна температура и относителна влажност 50 ± 1%.

Съдържание на влага. Определя се по експресен тегловен метод на електронна везна с инфрачервено нагряване (Sartorius Thermo Control YTC 01 L). За целта претеглено количество филм (около 1g) се поставя върху блюдото на апарата. Суши се при 100ºC с помощта на инфрачервена лампа до постоянна маса. Количеството на влагата в пробата се изразява в проценти.

Дебелина на филма. Дебелината на филма се определя с дигитален микрометър с точност до 0.01mm ±5% в пет произволно избрани участъци от филма. Средните стойности на дебелината за всяка проба бяха използвани при определяне на якост на опън.

Оптични свойства. Цветовите параметри на биополимерните филми са определени чрез използване на системата *CIE* $L^Ga^Gb^G$ с колориметър Colorgrad 2000 (BYK-Gatdner Inc., USA). В системата *CIE* $L^Ga^Gb^G$ цветовите координати са съответно *L**: от черно (0) до бяло (100), *a**: червен цвят (+) зелен цвят (−), *b**: жълт цвят (+) син

and 0.6 g glycerol/g polymer in all others) as well as crosslinking agent (1% 0.1 M $CaCl_2$ solution for polysaccharide based films or 1% gallotanins from sumac for protein based films).

The prepared hydrocolloid FS were sonicated (10 min on ultrasonic bath, Ultrasonic system, M7652) and treated under vacuum to remove air bubbles.

Thereafter, the film-forming solutions were cast in plates (0.325 g FS/cm^2) and dried under vacuum (20 kPa, SPT-200 Vacuum Drier) at 35°C. Dry samples of sodium alginate films were placed in 0.3 M $CaCl_2$ solution for additional crosslinking, washed with distilled water to remove excess Ca^{2+}, and dried at 25°C. Before testing, all films were stored at room temperature and relative humidity 50 ± 1%.

Moisture content. Determined by an express weighting method on an electronic scale with infrared heating (Sartorius Thermo Control YTC 01 L). For this purpose, a weighed amount of film (about 1g) was placed on the apparatus plate. It was dried at 100ºC with the help of an infrared lamp until constant weight. The amount of moisture in the sample is expressed as a percentage.

Film thickness - The thickness of the film was determined with a digital micrometer with accuracy up to 0.01mm ±5% in five randomly taken sectors of the film. Mean thickness values for each sample were calculated and used in tensile strength calculations.

Optical properties - The colour parameters of the biopolymer films were determined using the *CIE* $L^Ga^Gb^G$ system with Colorgrad 2000 colorimeter (BYK-Gatdner Inc., USA). In the *CIE* $L^Ga^Gb^G$ system, the colour coordinates are: *L**: from black (0) to white (100), *a**: red (+) green (−), *b**: yellow (+) blue (−). Measurements were performed on a white

цвят (−). Измерванията са проведени върху бял стандартен фон (L^* = 94.26, a^* = − 0.92 и b^* = − 0.65). Всички измервания са извършени трикратно. Общото цветово различие (aE) се изчислява по формулата:

standard background (L^* = 94.26, a^* = −0.92, b^* = −0.65). All measurements were performed three times. The total colour difference (aE) is calculated using the formula:

$$\Delta E = \sqrt{(L^* - L)^2 + (a^* - a)^2 + (b^* - b)^2} \quad (1),$$

където L^*, a^* и b^* са стандарти, а L, a и b са стойностите на цветовите параметри на пробите филми.

Индексът на белота (Whiteness index, WI) се изчислява по формулата:

where L^*, a^* и b^* are standard, while L, a and b are the values of the colour parameters in the sample films.

Whiteness index (WI) is calculated using the formula:

$$WI = 100 - \sqrt{100 - (100 - L)^2 + a^2 + b^2} \quad (2)$$

Пропускливостта на светлина на филмите (LT) е определена по метод по ASTM (2009) чрез използване на U-Vis спектрофотометър (Libra S 22 U-Vis, Biochrom, USA) при дължина на вълната 560 nm и температура 22±2°C. Извършени са трикратни измервания на три филма от всеки вид биополимер.

Общо количество разтворими вещества (TSM). Определя се съгласно метод, описан от Rhim et al. (1998). Предварително претеглени проби от филмите с еднакъв размер (d=2 cm) се поставяха в йодни колби, съдържащи 100 ml дестилирана вода (с добавен натриев азид за инхибиране на евентуален микробиален растеж). Колбите се инкубираха в клатачна система (“Inkubations-Schüttelschrank BS-4 B.Braun”, 100 rpm) при температура 25°C за 24 часа. Неразтворените вещества се отделяха чрез филтруване и изсушаваха при температура 105°C за 24 часа, след което се претегляха. Количеството разтворени вещества се определя по формулата:

Light transmission (LT) of the films is determined by the ASTM (2009) method using a U-Vis spectrophotometer (Libra S 22 U-Vis, Biochrom, USA) with wavelength 560 nm and a temperature of 22±2°C. Three measurements of three films of each biopolymer were performed.

Total soluble matter (TSM) - TSM is determined using the method described by Rhim et al. (1998). Pre-weighed samples of the equal size films (d = 2cm) were placed in iodine flasks containing 100 ml of distilled water (with added sodium azide to inhibit eventual microbial growth).

The flasks were incubated in a shaker system (“Inkubations-Schüttelschrank BS-4 B.Braun”, 100 rpm) at 25°C for 24 hours. The undissolved substances were removed by filtration and dried at 105°C for 24 hours and then weighed. The quantity of dissolved substances is determined by the formula:

$$TSM = [(wi - wf)/wi] \times 100 \quad (3),$$

където wi е началното тегло, wf – теглото след филтруване и изсушаване.

where wi is the initial weight, wf – weight after filtration and drying.

Механични свойства. Направени са изпитвания за якост на опън *(Tensile Strength, TS*) и удължение при разкъсване (*Elongation at Ultimate strength, E),* съгласно стандарт BDS EN ISO 527-3:2003 с апарат за макромеханични изпитвания *UMT:2M* (*CETR-USA*). От всеки вид биополимерен материал са изследвани по 6 пробни тела, които представляват двустранни лопатки, с размери в mm – 55/6. Тестът бе прове-ден при стайна температура (20±2ºC), скорост – 0.017mm/s, сензор – 1000 N. Резултатите са представени като средни стойности от 6 измервания за всяка проба.

Статистически анализ. Резултатите от изследванията са анализирани с помощта на статистическа програма на Microsoft Excel 2013. Използван е еднопосочен анализ на променливите (ANOVA). Данните са представени като средни стойности ± стандартно отклонение (SD). За всички сравнения е прието ниво на сигнификантност $p<0.05$.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Външен вид, съдържание на влага и общо количество разтворими вещества

Визуално всички филми са хомогенни, гъвкави, без чупливи участъци и без наличие на въздушни мехурчета (Таблица 2). При приложено еднакво количество филмообразуваща смес за определена площ (0.325 g FS/cm^2) получените филми са с дебелина от 0.06 mm при алгинатните филми до 0.20 mm при филмите на основа желатин, които са с най-високо процентно съдържание на биополимер. Дебелината на получените материали зависи от концентрацията на биополимера, използваните пластификатори и омрежващи агенти и приложената технология.

Остатъчното влагосъдържание при протеиновите филми е по-ниско, което се дължи на образуването на по-компактна полимерна структура и по-висока степен на омрежване. По-голямото количество

Mechanical properties

Tensile strength (TS) and Elongation at Ultimate strength *(E)* tests were conducted, according to the BDS EN ISO 527-2:2002 (2002) standard with a *UMT:2M* macromechanical test apparatus (*CETR-USA*). Of each type of biopolymer material, 6 sample bodies (dimensions in mm - 55/6) were tested. The test was performed at room temperature (20±2ºC), speed – 0.017 mm/s, sensor – 1000 N. The results are presented as averages of 6 measurements for each sample.

Statistical analysis. The results of the experiments were analyzed using a statistical program of Microsoft Excel 2013. One-way analysis of variables (ANOVA) was used. Data are presented as mean ± standard deviation (SD). A significance level of $p<0.05$ was assumed for all comparisons.

RESULTS AND DISCUSSION

Appearance, moisture content and total soluble matter:

Visually, all films are homogeneous, flexible, with no brittle areas or air bubbles (Table 2). With an equal amount of film-forming mixture per area (0.325 g FS/cm^2) the thickness of the resulting films ranges between 0.06 mm for alginate films to 0.20 mm for gelatin-based films, which have the highest percentage of biopolymer content. The thickness of the resulting materials depends on the biopolymer concentration, the plasticizers and crosslinking agents used and the applied technology.

The residual moisture content of the protein films is comparatively lower, due to the formation of a more compact polymer structure and a higher degree of crosslinking. The higher residual moisture

на остатъчна влага в останалите варианти филми се дължи на високата хигроскопичност на полизахаридите.

Общото количество разтворими вещества е показател за степента на разтваряне на биополимерния матрикс във водна среда. От обобщените резултати от теста се вижда, че при филми на различна основа TSM е от 42,85% до 99,13%. Протеиновите и композитните филми показват значително по-малка разтворимост (от 42.9% при колаген до 66.6% при AG-P2) в сравнение с еднокомпонентния пектинов филм. Техните резултати са подобни на стойностите, получени при алгинатния филм (47,88%). Получените резултати (с изключение на пектиновия филм) са сравними с разтворимостта на ядивни филми (Mohajer, 2017).

content of the other film variants is due to the high hygroscopicity of the polysaccharides.

The total amount of soluble substances is an indication of the degree of dissolution of the biopolymer matrix in water medium. In the summarised test results, it can be seen that for films on various basis, TSM ranges from 42.85% to 99.13%. Protein and composite films showed significantly less solubility (from 42.9% for collagen to 66.6% for AG-P2) compared to the one-component pectin film. Their results are similar to those obtained with the alginate film (47.88%). The obtained results (with the exception of those of pectin film) are comparable to the solubility of edible films (Mohajer, 2017).

Таблица 2. Основни характеристики на биополимерните филми
Table 2. Characteristics of the biopolymer films

Филми Films	Външен вид Appearance	Дебелина* Thickness (mm)	Влагосъдържание* Moisture (%) (n=3)	*TSM (%)** (n=3)
G		0.20±0.01	10.35±0.25	51.04 ±0.09
C		0.10±0.01	10.49±0.29	42.85±0.10
AG		0.06±0.01	11.52±0.21	47.88±0.10
P		0.10±0.01	13.09±0.37	99.13±0.22
V_1AG-P		0.07±0.01	12.05±0.32	48.47±0.12
V_2AG-P		0.07±0.01	11.10±0.24	49.57±0.10
V_3AG-P		0.09±0.01	14.85±0.41	66.61±0.23

* Data reported are average values ± standard deviations

Оптични свойства

За по-доброто разбиране на оптичните характеристики на филмите са анализирани цветовите параметри (L, a, b), общото цветово различие (ΔE), индексът на белота (WI) и про-пускливостта на светлина (LT). Както се вижда от Таблица 3 алгинатните филми са най-светли, докато пектиновите и протеиновите филми и са с жълтеникав цвят. При тях има значително намаляване на L стойностите и повишаване на b и ΔE стойностите ($p<0,05$). Предполагаме, че разликите в цвета се дължат както на различния вид и качествата на биополимерите, така и на влиянието на омрежващите агенти. За определяне на бариерните свойства спрямо светлината е измерена пропускливостта на светлина. Най-висока стойност за LT има при желатиновия филм, а най-ниска при другия протеинов филм – колагеновия, като разликата е статистически значима ($p<0,05$). Пропускливостта за светлина при алгинатния филм е близка до желатиновия филм и сравнително по-висока от филмите на база колаген и пектин. При композитните филми се наблюдава намаляване на LT с увеличаване на процентното съдържание на пектина. По наши сведения данни в литературата за стойности на пропускливост на светлина, измерени при дължина на вълната 560 nm има само при изследване на Ogur and Erkan (2015). Стойностите на LT на желатиновите и на колагеновите филми при нашето изследване са близки до тези, които авторите съобщават за желатиновите и колагеновите филми.

Optical properties

For a better understanding of the optical characteristics of the films, color parameters (L, a, b), total color difference (ΔE), whiteness index (WI) and light transmission are analyzed. As can be seen from Table 3, alginate films are the brightest while pectin and protein films have a yellowish colour.

They have a significant decrease in L values and an increase in b and ΔE values ($p<0.05$). We assume that colour differences are due to the differences in types and properties of the biopolymers, as well as to the influence of the cross-linking agents.

Light transmission (LT) was measured to determine light barrier properties. The highest LT value is measured for the gelatin film, while the lowest – for the other protein film – collagen, the difference being statistically significant ($p<0.05$). The light transmision value of the alginate film is close to the that of the gelatin film and comparatively higher than those of collagen and pectin based films. In composite films, LT decreases with the increase in the percentage content of pectin. To our knowledge, data on light transmission values, measured at wavelength of 560 nm is only available in work of Ogur and Erkan (2015). The TL values of gelatin and collagen films in our study are similar to those reported by the authors for gelatin and collagen films.

Таблица 3. Цветови параметри и пропускливост за светлина на биополимерните филми

Table 3. Colour parameter and light transmission (LT) of biopolymer films*

Филми/Films	L	a	b	ΔE	WI	LT,%
C	65,72±0,33	-0,87±0,04	8,53±0,09	30,03±0,15	64,47±0,31	21,70±0,01
G	67,49±0,34	0,66±0,01	17,22±0,10	32,22±0,16	62,87±0,32	61,10±0,01
AG	83,94±0,47	-1,61±0,01	1,53±0,01	10,85±0,09	83,60±0,71	60,40±0,01
P	65,40±0,32	-1,36±0,02	5,94±0,09	29,69±0,14	64,71±0,32	47,00 ±0,01
AG-P_1	74,00±0,37	-0,76±0,01	1,91±0,01	20,50±0,10	74,00±0,37	57,40±0,01
AG-P_2	71,69±0,36	-0,90±0,01	1,67±0,02	22,76±0,12	71,63±0,35	49,10±0,01
AG-P_3	68,20±0,34	-0,69±0,01	2,18±0,04	26,26±0,24	68,03±0,40	48,00 ±0,01

* Data reported are average values ± standard deviations

Механични свойства

Механичните характеристики на филмите и покритията се отразяват пряко върху качеството и функционалните им свойства. Най-важни параметри при тези тестове са якост на опън (TS) и удължение при разкъсване (E). TS е оценка за механичната здравина, дължаща се на кохезионните сили между полимерните вериги в структурата на филма. E изразява максималната промяна в дължината на изпитвания материал преди разкъсване, изразено в проценти спрямо първоначална-та дължина на недеформирания образец.

Получените данни показват, че филмите са с добри структурно-механични характеристики (Фигури 1 и 2). При протеиновите филми бяха установени стойности за якост на опън (TS) – 3.24 MPa (колаген) и 10.54 MPa (желатинови филми). Резултатите от изпитването за удължаване при разкъсване (E) варираха от 32.08 % до 173.4%. При алгинатните филми TS бе 18.30 MPa, а E –78.14 %., докато при пектиновите филми стойностите на TS бяха значително по-ниски: - 2.21 MPa, а на E – значително по-високи (273.3%). При композитните филми получени от смеси алгинат-пектин в съотношение 1:2; 1:1; 2:1 се наблюдава значително подобряване на механичните свойства, в сравнение с едно-компонентните филми на основа алгинат и на основа пектин. Най-добри резултати има при смеси в съотношение 1:1 със стойности на TS 53.52 MPa и E – 34.47 %. Механичната здравина на разработените желатинови и колагенови филми, кореспондира с цитирани в литературата данни (De Carvalho and Grosso, 2006). Стойностите на TS за алгинатните филми са близки до тези на Olivas and Barbosa-Cánovas (2008), но се различават от други цитирани в литературата данни (Benavides et al., 2012), като по-ниските стойности за TS и по-високите стойности за E

Mechanical properties

The mechanical characteristics of films and coatings directly affect their quality and functional properties. The most important parameters in these tests are tensile strength (TS) and elongation at ultimate strength (E). TS is an estimate of the mechanical strength due to the cohesive forces between the polymer chains in the film structure. E expresses the maximum change in length of the test material before tearing, expressed as a percentage of the original length of the undeformed sample.

The data obtained show that the films have good structural and mechanical characteristics (Figures 1 and 2). Protein films were found to have a tensile strength (TS) of 3.24 MPa (collagen) and 10.54 MPa (gelatin films). The results of the elongation at ultimate strength test (E) varied from 32.08% to 173.4%. For alginate films TS was 18.30 MPa, and E –78.14 %., while for pectin films the values of TS were much lower: TS - 2.21 MPa, and for E – much higher (273.3%).

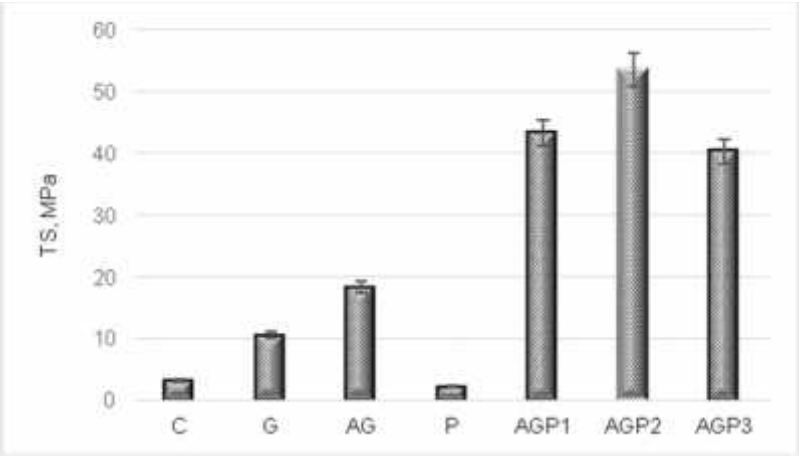
In composite films made from alginate-pectin mixtures in a ratio of 1:2; 1:1; 2:1, there was a significant improve-ment in mechanical properties compared to mono-component alginate and pectin based films. The best results were found for mixtures with a ratio of 1:1 - TS – 53.52 MPa and E – 34.47%.

The mechanical strength of the developed gelatin and collagen films corresponds to the data quoted in literature (De Carvalho and Grosso, 2006). TS values for alginate films are similar to those of Olivas and Barbosa-Cánovas (2008), but differ from other data (Benavides et al., 2012), as lower TS values and higher E values can be explained by differences in biopolymer concentration, plasticizer applied, and

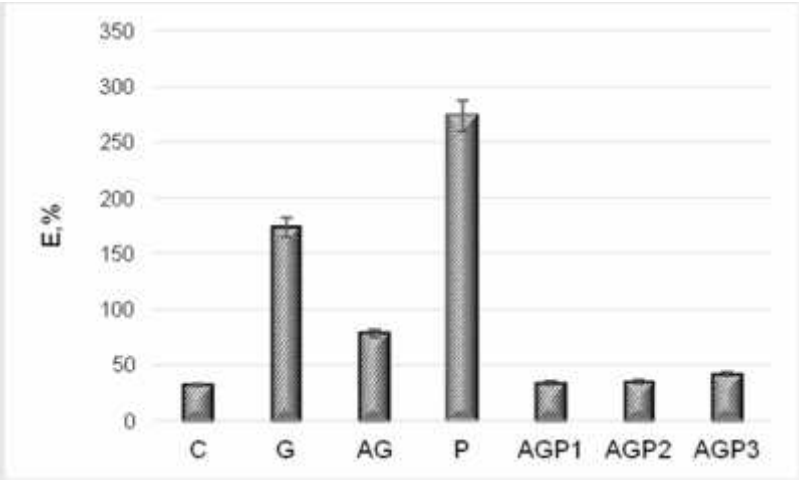
могат да се обяснят с разликите в концентрацията на биополимера, приложеният пластификатор и метод на омрежване. Стойностите за механични свойства на получените биополимерни филми (протеинови,полизахаридни и композитни) са сравними и със синтетичните филми като полиетилен с ниска плътност с TS стойности от 8.2 до 31.4 MPa (Kumar et al, 2010), полиетилен с висока плътност със стойности 22-31 MPa и полипропилен с TS 31-38 MPa (Rhim, 2012).

crosslinking method.

The values for the mechanical properties of the resulting biopolymer films (protein, polysaccharide and composite) are comparable to those of synthetic films such as low density polyethylene with TS values of 8.2 to 31.4 MPa (Kumar et al., 2010), high density polyethylene with values of 22-31 MPa and polypropylene with TS 31-38 MPa (Rhim, 2012).



Фиг. 1. Якост на опън (*TS)* на биополимерни филми
Fig. 1. Tensile strength (*TS)* of the biopolymer films



Фиг. 2. Удължение при разкъсване (E) на биополимерни филми
Fig. 2. Elongation at ultimate strength (E) of the biopolymer films

ИЗВОДИ

Крайните продукти от предложената технология представляват екологично чисти филми, получени от биополимери от възобновяеми източници. От изследваните проби, най-добри структурно-механични характеристики бяха установени при смеси алгинат-пектин в съотношение 1:2; 1:1; 2:1. Наблюдава се значително подобряване на механичните свойства, в сравнение с еднокомпонентните филми на основа алгинат и на основа пектин. Всички разработени филми са добра основа за включване на антимикробни и антиоксидантни вещества от растителен произход или други естествени функционални съставки, което може да повиши хранителната стойност и подобри качеството на храните, опаковани в тях.

CONCLUSIONS

The end products of the proposed technology are environmentally friendly films derived from biopolymers from renewable sources. Of the samples tested, the best structural and mechanical characteristics were obtained in alginate-pectin mixtures in 1:2; 1:1 and 2:1 ratios.

Significant improvement in mechanical properties compared to monocomponent alginate-based and pectin-based films was observed. All developed films are a good basis for including antimicrobial and antioxidant substances of plant origin or other natural functional ingredients, which can increase the nutritional value and improve the quality of the food packaged in them.

БЛАГОДАРНОСТИ

Това изследване е подкрепено от Министерството на образованието и науката в рамките на Национална програма за научни изследвания "Здравословни храни за силна биоикономика и качество на живот", одобрена от DCM # 577 / 17.08.2018.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Bulgarian Ministry of Education and Science under the National Research Programme "Healthy Foods for a Strong Bio-Economy and Quality of Life" approved by DCM # 577 / 17.08.2018".

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Araghi, M., Moslehi, Z., Nafchi, A. M., Mostahsan, A. Salamat, N. and A. D. Garmakhany**, 2015. Cold Water Fish Gelatin Modification by a Natural Phenolic Cross-linker (Ferulic Acid and Caffeic Acid). *Food Sci Nutr.*, 3 (5), 370-375.
2. ASTM 2009. D1746-09 Standard Test Method for Transparency of Plastic Sheeting1. American Society for Testing and Materials International Standards, Canada, DC.
3. **Azeredo, H.M.C. and K. W. Waldron**, 2016. Crosslinking in Polysaccharide and Protein Films and Coatings for Food Contact - a review. *Trends in Food Science & Technology*, 52: 109-122.
4. BDS EN ISO 527-3:2003. Plastics-Determination of Tensile Properties - Plastics - Determination of Tensile Properties - Part 3: Test Conditions for Films and Sheets.
5. **Benavides, S., R. Villalobos-Carvajal and J. E. Reyes**, 2012. Physical, Mechanical and Antibacterial Properties of Alginate Film: Effect of the Crosslinking Degree and Oregano Essential Oil Concentration. *Journal of Food Engineering*, 110 (2), 232-239.
6. **Bigi, A, G Cojazzi, S Panzavolta, N. Roveri and K. Rubini**, 2002. Stabilization of Gelatin Films by Cross Linking with Genipin. *Biomaterials*, 23: 4827-4832.

7. **Bourtoom, T.**, 2008. Edible Films and Coatings: Characteristics and Properties. *International Food Research Journal*, 15 (3), 237-248.
8. **De Carvalho, R. and C.R.F. Grosso**, 2006. Characterization of Gelatin Based Films Modified with Transglutaminase, Glyoxal and Formaldehyde. *Food hydrocolloids*, 18 (5), 717-726.
9. **Espitia, P. J., W. X. Du, R. J. Avena-Bustillos, N. F. F. Soares and T. H. McHugh**, 2014. Edible Films from Pectin: Physical-mechanical and Antimicrobial Properties - a review. *Food Hydrocolloids*, 35: 287-296.
10. **Koushki, M.R., M.H. Azizi, M. Azizkhani and P. Koohy-Kamaly**, 2015. Effect of Different Formulations on Mechanical and Physical Properties of Calcium Alginate Edible Films. *Journal of Food Quality and Hazards Control*, 2: 45-50.
11. **Kumar, P, KP Sandeep, S Alavi, VD Truong and R.E. Gorga**, 2010. Effect of Type and Content of Modified Montmorillonite on the Structure and Properties of Bio-nanocomposite Films Based on Soy Protein Isolate and Montmorillonite. *J Food Sci.*, 75 (5), 46-56.
12. **Mohajer, S., M. Rezaei and S. F. Hosseini**, 2017. Physico-chemical and Microstructural Properties of Fish Gelatin/Agar Bio-based Blend Films. *Carbohydrate Polymers*, 157(Suppl. C): 784-793.
13. **Ogur, S. and N. Erkan**, 2015. The Physicochemical Properties of Edible Protein Films. *Italian Journal of Food Science*, 27(1), 64-74.
14. **Olivas, G. I. and G. V. Barbosa-Cánovas**, 2008. Alginate Calcium Films: Water Vapor Permeability and Mechanical Properties as Affected by Plasticizer and Relative Humidity. *LWT - Food Science and Technology*, 41 (2), 359-366.
15. **Ramos, M., A. Valdés, A. Beltrán and M. C. Garrigós**, 2016. Gelatin-bazed Films and Coatings for Food Packaging Applications. *Coatings*, 6(4), 41; doi:10.3390/coatings6040041.
16. **Rhim, J. W.**, 2004. Physical and Mechanical Properties of Water Resistant Sodium Alginate Films. *LWT - Food Science and Technology*, 37(3), 323-330.
17. **Rhim, J. W.**, 2012. Physical-mechanical Properties of Agar/κ-carrageenan Blend Film and Derived Clay Nanocomposite Film. *Journal of Food Science*, 77, 66-73.
18. **Rhim, J.W., A. Gennadios, C.L. Weller and M.A. Hanna**, 1998. Soy Protein Isolate–dialdehyde Starch Films. *Industrial Crops and Production*, 8 (3), 195-203.
19. **Wittaya, T.**, 2012. Protein-Based Edible Films: Characteristics and Improvement of Properties. Structure and Function of Food Engineering. InTech Open 10.5772/48167.

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2019, 22 (3), 223-233
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan
ISSN 1311-0489 (Print)
ISSN 2367-8364 (Online)

Установяване ефекта на отпадъчни варови материали върху добива и качеството на растителната продукция

Елена Златарева[1]*, Nicholas Kathijotes[2], Светла Маринова[1]

[1]ИПАЗР " Н. Пушкаров" София
[2]Технически Университет, Никозия, Кипър

Establishment the Effect of Waste Lime Materials on the Yield and Quality of Plant Production

Elena Zlatareva[1]*, Nikolas Kathijotes[2], Svetla Marinova[1]

[1]ISSAPP "N. Poushkarov", Sofia, Bulgaria
[2]University of Nicosia, P.O. Box 24005 - Cyprus
**E-mail: zlatareva.as@abv.bg*

Original scientific paper

Received: 17.04.2019 *Accepted:* 13.06.2019 *Published:* 05.09.2019

РЕЗЮМЕ

В условията на вегетационен опит е изследван ефектът на варов шлам и пепел от изгаряне на дървесина, вторични продукти от производството на фирма "Огняново К "АД върху добива и качеството на растителната продукция от царевица и зелен фасул. Изпитани са няколко норми на варуване: добавяне на изследваните материали към почвата в количество, необходимо да неутрализира ½ от обменната киселинност, 2 пъти обменната киселинност и варуване спрямо общата киселинност ($H_{8,2}$). Резултатите от вегетационните опити установяват, че с повишаване нормата на варовите материали се повишава и добивът при двете тествани култури в сравнение с контролите. Това е по-силно изразено при използване на пепелината. Най-висок добив и за двете култури се получава при варианта, варуван 2 пъти по обменния алуминий. Химичната характе-

SUMMARY

Pot experiment was conducted to establish the effect of lime sludge and ash from wood which is the secondary product from "Ognyanovo K" output. It was established the effect on the yield and quality of crop production from corn and green beans. Several norms of lime was tested: adding studied materials into the soil in amount necessary to neutralize ½ of exchangeable acidity, double exchange acidity and the total acidity ($H_{8,2}$).

The results of the pot experiments found, that by increasing the rate of lime materials the yield of two tested crops is increased in comparison to the controls variants. This trend is well noticeable in variants with added wood ash.

The highest yield for both crops are produced by variants with double aluminum exchangeable acidity.

ристика на растителната продукция при двете тествани култури установи, че измерените стойности са в оптимални концентрации и не могат да окажат вредно влияние при използването им като храна за животните и хората.

Ключови думи: кисели почви, варови материали, химична характеристика на растителната продукция, царевица, зелен фасул

The chemical characterization of plant production in two indicator crops found, that the measured values are in optimal concentrations and is not presenting a risk for consumption by animals and human.

Key words: lime materials, acid soils, chemical characterization of crop production, corn, green beans

УВОД

Вкисляването на почвите е процес с неблагоприятни последици за тяхното плодородие и развитието на растенията, тъй като при ниски стойности на pH на почвата растенията се депресират, а при много ниски загиват (Nikolov et al., 2004). В киселите почви развитието на растенията може да бъде ограничено от различни, специфични почвено-химични фактори. Алуминиевата и манганова токсичност и дефицитът от калций, магнезий, азот и фосфор са вероятно най-важните лимитиращи растежа на растенията фактори в киселите почви (Ganev, 1990; Taneva and Vladeva, 2004). Това налага да коригираме киселата реакция на почвата чрез внасяне на различни видове мелиоранти, с цел да получим качествена продукция върху кисели почви (Ganev, 1990, Baligar et al., 1991, Borisov and Dinev, 2000).

В нашата и световната практика е установено, че при неправилно и превишено варуване, депресията в развитието на културите и намаляването на добива са по-големи, отколкото при прякото влияние на киселинността (Donev et al., 1990).

Целта на настоящето изследване е да се установи въздействието на варов шлам и пепел от изгаряне на дървесина от производството на фирма „Огняново К“ АД, върху добива и качеството на царевица и зелен фасул в условията на вегетационни опити.

INTRODUCTION

The process of making the soils acidity is a process with unfavourable results for their fertility and the development of the plants, so that by low values of pH of the soil the plants are depressed, and by very low levels of pH the plants died (Nikolov et al., 2004). In the acid soils the development of the plants can be limited from different specific soil chemical factors. The toxicity of aluminum and manganese and the deficit of calcium, magnesium, nitrogen and phosphorus are probably the most important limiting factors for the development of the crops in the acid soils. (Ganev, 1990; Taneva and Vladeva, 2004). In this case it is important to make a correction the acid reaction of the soil with import of different kinds of meliorates with the aim to receive quality production over acid soils (Ganev, 1990; Baligar et al., 1991; Borisov and Dinev, 2000).

By our and in the world practice is determined, that by irregular and liming over the norms, the depression by the development of the crops and decrease of the crop yield production are higher in comparison of the direct influence of the acid-manganese characteristic (Donev et al., 1990).

The aim of this research is to determine the influence of the lime sludge and ashes from the wood in the production firm “Ognyanovo K” Ltd over the crop yields production and the quality of the maize and green beans by the pot experiments.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

За установяване ефекта на двата отпадъчни продукта – калциев преципитат /варов шлам/ и пепел от изгаряне на дървесина е изведен вегетационен опит с две тествани култури – царевица и зелен фасул върху кисела почва от с. Звъничево, Пазарджишки окръг. Оценката на двата продукта и настъпилите промени в киселинните свойства на почвата след завършване на вегетационните експерименти са представени в друга статия /Zlatareva and Marinova, 2016/.

Опитът с двата отпадъчни материали, съдържа следните варианти:

1. Контрола - без торене
2. Контрола с минерално торене- NPK
3. Норма на неутрализиращия агент, изчислена по 0,5 от обменния алуминий+ NPK
4. Норма на неутрализиращия агент, изчислена по 2,0 от обменния алуминий + NPK
5. Норма на неутрализиращия агент, изчислена по $H_{8,2}$ + NPK

Торовият фон е с минерални торове в количество по 300 $mg.kg^{-1}$, внесени под форма на NH_4NO_3, $Ca(H_2PO_4)_2.2H_2O$, KCl и служи също като своеобразна контрола за съпоставка на действието на двата мелиоранта. Опитите са заложени в съдове с вместимост – 3 kg. Всеки вариант съдържа по 3 повторения. В растенията общият азот е определен по метода на Келдал, чрез разлагане с концентрирана H_2SO_4 и 30% H_2O_2. Останалите макро- и микроелементи са определени чрез “сухо” изгаране в муфелни пещи и последващо разтваряне в 20% HCl и отчитане на атомно-абсорбционен спектрофотометър.

MATERIAL AND METHODS

For determination of the effect of the both waste products – calcium precipitant /lime sludge/ and ashes from the wood is made pot experiment with two tested crops – maize and green beans over acid soil from Zvanitchevo – village, Pazardshik region. The estimation of both products and the realized changes in the acid characteristics after the ending of the pot experiments are shown in another article /Zlatareva and Marinova, 2016/.

The experiment with the both waste materials has the following variants:

1. Control without fertilization.
2. Control with mineral fertilization - NPK
3. Norm of the neutralization agent, computed by 0,5 from the exchangeable aluminum+ NPK
4. Norm of the neutralization agent, computed by 2,0 times from the exchangeable aluminum + NPK
5. Norm of the neutralization agent, computed by $H_{8,2}$ + NPK

The fertilization background is with mineral fertilization in quantity for 300 $mg.kg^{-1}$, imported with the form of NH_4NO_3, $Ca(H_2PO_4)_2.2H_2O$, KCl and it is like a control for comparison of the action of the both meliorates. The experiments are made in two containers wit volume – 3 kg. Every variant contains by 3 times repetitions. In the plants the common nitrogen is determined with the methods of Keldal, by decomposition with concentrated H_2SO_4 and 30% H_2O_2. The rest macro- and micro-elements are determined with “dry” burn in muffle ovens and after following dissolve in 20% HCl and determined with atomic-sorption spectrophotometer.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

А – Влияние на варуването с варов шлам и пепел от изгаряне на дървесина върху добива от тестваните култури – царевица и зелен фасул

След прибиране на опитите е отчетен добивът от надземна биомаса на тестваните култури и е направена математико-статистическа обработка на получената информация. В опита свежата маса на растенията е определена тегловно в грамове на съд. Вегетационните опити показват, че царевицата и зеленият фасул се развиват нормално върху почвата с двата вида мелиоранта.

От резултатите показани в Таблица 1 се вижда, че с повишаване на нормата на варовите материали /варов шлам и пепел/ се повишава и добивът от двете тества на култури, в сравнение с контролните варианти /Borisov et al., 1997; Nikolov and Zlatareva, 2007/. При най-високата норма на мелиорантите се забелязва слабо понижение на добивите. Вероятна причина за депресията в развитието на царевичното растение е нарушеният баланс в постъпването и усвояването на хранителните елементи от растенията при значителното повишаване на pH на почвата. При царевицата най-висок среден добив от съд е получен при вариант 14 – варуван с пепелина в норма 2 пъти по обменния Al +NPK. Наблюдава се разлика в получената биомаса от царевица между двата мелиоранта. При употребата на пепел от изгаряне на дървесина, добивите са значително по-големи от тези при употребата на варов шлам за вариантите с извършено варуване по 0,5 и 2 пъти от обменния Al. Това вероятно се дължи на по-добрите агрохимични показатели на пепелината.

RESULTS AND DISCUSSION

A – Influence of the using of lime sludge and ashes from wood over the crop yield production from tested plants – maize and green beans.

After the harvesting of the experiments is determined the production of biomass from over soil of the tested plants and it is made mathematical-statistical calculations of the received information. By the experiment the fresh biomass of the plants is determined in grams for every container. The pot experiments show us that the maize and the green beans are developing normally over soil with the both kind of meliorates.

From the results, given in Table 1, can be shown that with the increase of the norms of the lime materials /lime sludge and ashes/ increases the crop yield production from the both tested plants in comparison to the control variants /Borisov et al., 1997, Nikolov and Zlatareva, 2007/. By the highest norm of the meliorates it can be shown slow decrease of the crop yield production. Probably reason of the depression of the development of the maize plant is disturb of the balance by the income and assimilation of the food elements from the plants by great increase of the pH of the soil. By the maize the highest middle crop yield production from container is received by the variant 14 – limed with ashes in norms 2 times by exchangeable Al +NPK. It is shown the difference by the received biomass from maize between the both meliorates. By the use of ashes from wood the crop yield production is greater in comparison to this by utilization of lime sludge for the variants by using of lime with 0,5 and 2 times for exchangeable aluminum. This is probably as a result from the better agro-chemical parameters of the ashes.

Таблица 1. Добив зелена маса от тест културите, в грамове на съд
Table 1. Yield green mass of the test crops in grams of container

Варианти Variants	I-во повторение I-st repetition	II-ро повторение II-nd repetition	III-то повторение III-rd repetition
Варов шлам / Lime sludge			
Тест култура царевица / Test crop corn			
1. Контрола 1. Control	35,88	40,08	29,40
2. Контрола +NPK 2. Control +NPK	51,12	56,66	45,96
3. Варов шлам по ½ от обм. Al +NPK 3. Lime sludge by ½ from exch. Al +NPK	53,78	64,48	45,89
4. Варов шлам 2 пъти по обм. Al +NPK 4. Lime sludge 2 times from exch, Al +NPK	60,74	68,16	52,76
5. Варов шлам по $H_{8,2}$ +NPK 5. Lime sludge by $H_{8,2}$ +NPK	50,62	62,64	59,26
Тест култура зелен фасул / Test crop green beans			
6. Контрола 6. Control	11,80	11,85	10,37
7. Контрола +NPK 7. Control +NPK	20,82	24,18	20,66
8. Варов шлам по ½ от обм. Al +NPK 8. Lime sludge by ½ from exch. Al +NPK	30,60	28,84	21,52
9. Варов шлам 2 пъти по обм. Al +NPK 9. Lime sludge 2 times from exch, Al +NPK	30,41	29,00	22,80
10. Варов шлам по $H_{8,2}$ +NPK 10 Lime sludge by $H_{8,2}$ +NPK	26,78	23,24	22,66
Пепел от изгаряне на дървесина / Ash wood			
Тест култура царевица / Test crop corn			
11. Контрола 11. Control	37,60	42,10	40,74
12. Контрола +NPK 12. Control +NPK	61,32	65,38	46,04
13. Пепелина по ½ от обм. Al +NPK 13. Ashes by ½ from exch. Al +NPK	71,36	63,20	66,48
14. Пепелина 2 пъти по обм. Al +NPK 14. Ashes 2 times from exch, Al +NPK	72,02	71,52	68,44
15. Пепелина по $H_{8,2}$ +NPK 15. Ashes by $H_{8,2}$ +NPK	56,62	58,18	55,04
Тест култура зелен фасул / Test crop green beans			
16. Контрола 16. Control	15,46	11,00	11,08
17. Контрола +NPK 17. Control +NPK	26,78	30,76	30,74
18. Пепелина по ½ от обм. Al +NPK 18. Ashes by ½ from exch. Al +NPK	30,36	33,02	29,82
19. Пепелина по 2 пъти по обм. Al +NPK 19. Ashes 2 times from exch, Al +NPK	38,04	31,29	29,54
20. Пепелина по $H_{8,2}$ +NPK 20. Ashes by $H_{8,2}$ +NPK	26,8	28,92	31,66

При зеления фасул големината на добивите по-плавно нараства с повишаване нормата на внесения мелиорант. По-високи добиви се получават при употребата на пепелина. И тук както при царевицата най-голяма получена биомаса има при варианта варуван с пепелина, в норма 2 пъти по

By the green beans the quantity of the crop yield production increases with the increases with the norm of the imported meliorates. Higher crop yield production is by the utilization of ashes. Like by maize, the greatest biomass is received by the variants with liming with ashes in the norm 2 times by

обменния Al - 32,96 g. При най-високата норма на мелиорантите и при зеленият фасул се забелязва слаба депресия в добивите.

За да се оцени влиянието на внесените почвени подобрители върху добивите от царевица и зелен фасул, е извършен дисперсионен анализ на получените данни /Toncheva et al., 2015a; 2015b/.

Резултатите от статистическата обработка показват, че влиянието на изпитвания варов шлам върху добива от царевица, внасян като почвен подобрител, е статистически доказано при вероятност за грешка p<1%. Доказаност на разликите в добивите има само между контролата и всички останали варианти.

Установи се, че влиянието на изпитвания подобрител пепелина върху добива от царевица е статистически доказано при ниво на вероятност p<0,1%. Съществува доказаност на разликите в добивите както между контролата и всички останали варианти на торене, така и между варианта с внесен NPK и варианти 3 и 4 (с пепелина по 0,5 от обменния Al + NPK и пепелина 2 пъти от обменния Al + NPK). При останалите варианти няма доказана разлика между добивите.

При съвместния анализ на данните за добива от царевица свежа биомаса с внесени варов шлам и пепелина се установи, че доказаност на разлики в добивите, получени при двата подобрителя, съществува само при вариант 3 (варов шлам по 0,5 от обменния Al + NPK и пепелина по 0,5 от обменния Al + NPK) /Таблица 2/.

exchangeable Al - 32,96 g. By the highest norm of meliorates and by the green beans can be shown slow depression in the crop yields production,

For estimation of the influence of the soils fertilizer over the crop yield production by maize and green beans it is made dispersion analyze of the received data. /Toncheva et al., 2015a; 2015b/.

The results of the statistical calculation show, that the influence of the controlled lime sludge over the crop production from maize, imported as a soil fertilizer, is statistical determined by probably mistake from p<1%. The determination of the differences in the crop production is only between the control and the all other variants, so between the other variants there are no determined differences.

It is determined, that the influence of the tested fertilizer ashes over the crop production of maize is statistical determined by level of probably p<0,1%. It exists determination of the differences between the control and all other variants of fertilization and the variants with imported NPK and the variants 3 and 4 (with ashes by 0,5 exchangeable Al + NPK and ashes 2 times from the exchangeable AL+NPK). By the other variants they are no determined difference of the crop production.

By the complex analyze of the data for the crop production of maize fresh biomass with imported lime sludge and ashes is determined, that the determinate differences by the crop production, received by the both fertilizers, exist only by variants 3 (lime sludge by 0,5 from the exchangeable Al + NPK and ashes by 0,5 from exchangeable Al + NPK) /Table 2/.

Таблица 2. Сравнитлна оценка на дисперсионен анализ на данните за добивите от царевица – варов шлам и пепелина
Table 2. Comparative assessment of dispersion analysis of data on yields of corn – lime sludge and ash

Източник на вариране Source of lime	DF	SS	SS (%)	S^2	F-отношение/P% F-relation/P%
Общо Common	29	3947,003	100,00	-	-
Варианти (V) Variants (V	4	2718,130	68,87	679,53	18,131***
Торене (F)	1	324,131	8,21	324,13	8,648 **
V*F	4	155,163	3,93	38,791	1,035
Грешка / Mistake	20	749,580	18,99	37,479	-

Вар. на торене Variants of fertilization	Вид подобрител Kind fertilizer	Ср.добив (g св.т.) Middle crop production
	1 варов шлам 1 lime sludge	35,120
	2 пепелина 2 ashes	40,147
		51,247
		57,580
		54,717
		67,013
		60,553
		70,660
		57,507
		56,613

НМДР 5%= 10,427 НМДР 1%=14,221 НМДР 0,1%=19,245

Дисперсионният анализ на данните за добив зелен фасул свежа биомаса показва, че влиянието както на внесения варов шлам като почвен подобрител, така и на пепелината, е статистически доказано при вероятност за грешка p<0,1%. При внесен варов шлам няма доказаност на разликите в добивите между отделните варианти с внесен подобрител. Съществуват само разлики между контролата и всички останали варианти в опита (докаказани при вероятност 0,1%). При опита с пепелина резултатите са аналогични.

При съвместния анализ на данните за добивите от зелен фасул, получен от двата опита се вижда, че доказаност на разликите между добивите има само при вариант 4 (НМДР 1% при внасяне на пепелина 2 пъти по обменния Al и на варов шлам 2 пъти по обменния Al /Таблица 3/.

The dispersion analyze of the data for the crop production of green beans shows, that the influence of the imported lime sludge as a soil fertilizer and with ashes, is statistical determined by probably mistake p<0,1%. By imported lime sludge it is not determined a difference for the crop production by the variants with imported fertilizer It exists only differences between the control and the all other variants by the experiments (determined by probably 0,1%).By experiments with ashes the results are the analogous.

By the complex analyze of the data from the crop production from green beans, received by the both experiments it is shown, that the determination difference is only by the variants 4 (НМДР 1% by import of ashes 2 times by exchangeable Al and of limed sludge 2 times of exchangeable AL) /Table 3/.

Таблица 3. Сравнителен анализ на дисперсионен анализ на данните за добивите от зелен фасул – варов шлам и пепелина
Table 3. Comparative assessment of dispersion analysis of data on yields of green beans - lime sludge and ash

Източник на вариране Source of lime	DF	SS	SS (%)	S^2	F-отношение/P% F-relation/P%
Общо / Common	29	1674,957	100,00	-	-
Варианти (V) Variants (V	4	1300,384	77,64	325,096	36,124***
Торене (F)	1	162,122	9,68	162,122	18,015***
V*F	4	32,464	1,94	8,116	-
Грешка / Mistake	20	179,987	10,74	8,999	-

Вар. на торене Variants of fertilization	Вид подобрител Kind of fertilization	Ср.добив (g св.т.) Middle crop production
1	1варов шлам 1 lime sludge	11,340
1	2 пепелина 2 ashes	12,513
2	1	21,887
2	2	29,427
3	1	26,987
3	2	31,067
4	1	27,403
4	2	32,957
5	1	24,227
5	2	29,127

НМДР 5%= 5,109 НМДР 1%=6,968 НМДР 0,1%=9,43

Средните добиви, получени от всички опити, са най-високи при вариант 4 (внесена пепелина 2 пъти по обменния Al и на варов шлам 2 пъти по обменния Al за двете култури), но статистически не е доказана разлика между тези добиви и получените от съседните два варианта на торене – вариани 3 и 5.

Б/ Химична характеристика на растителната продукция

Оптималното съдържание на хранителните елементи в тестваните култури е дадено на Таблица 4. /Begman, 1996/

The middle crop production, received by all experiments, is highest by variant 4 (imported ashes by 2 time from the exchangeable Al and of limed sludge by 2 times of exchangeable Al for the both tested plants), but statistical it is not determined the difference between this crop production and the received by the other two variants of fertilization – variants 3 and 5.

B/ Chemical characteristic of the crop production

The optimal content of food elements by the tested plants is shown in the Table 4 /Begman, 1996/

Таблица 4. Оптимални съдържания на основни химични елементи в надземна част на зелен фасул и царевица
Table 4. Optimal content of basic chemical elements in the aboveground part of green beans and corn

Култура	Cu	Zn	Mn	P	K	Ca	Mg	N
Crops	mg/kg Dry matter			%				
Зелен фасул –начало на цъфтеж Green beans, Start of flowering	7-15	30-70	40-150	0,35-0,60	3,0-4,5	0,3-1,0	0,25-0,60	3,5-5,0
Царевица 40-60 cm височина Maize 40-60 cm high	6-12	20-60	30-150	0,30-0,60	3,5-5,0	0,3-1,0	0,15-0,30	2,5-5,0

От направения растителен анализ на листната маса от царевица се вижда, че с нарастване нормите на варовия шлам и пепелината, съдържанието на общ азот в растителната маса, слабо се увеличава. Съдържанието на P в растенията и при двата мелиоранта се движи между 1,7 до 4,9 $g.kg^{-1}$. Съдържанието на K е в границите от 38 до 61 $g.kg^{-1}$ и няма ясна изразена закономерност да се повишава концентрацията му в растителната тъкан с повишаване нормата на мелиорантите. В мелиорираните варианти почти всички изследвани тежки метали в растителните тъкани на царевичното растение намаляват съдържанието си, поради блокиране на тежките метали в почвата /Nikova, 2008/. Тенденцията е обратна при калция и магнезия /Таблица 5/.

From the plant analyze of the leaf mass from maize it is shown, that with the increase of the norms of lime sludge and the ashes, the content of the common nitrogen in the plant mass increases slow. The content of P in the plants by the both meliorates is between 1,7 and 4,9 $g.kg^{-1}$. The content of K is between 38 and 61 $g.kg^{-1}$ and has no clear expressed regularity to increase its concentration in the texture of the plant by the increase of the norm of the meliorates. By the variant with meliorates the content of heavy metals by nearly all tested texture of the plants maize decrease as a result of blocking of the heavy metals in the soil /Nikova, 2008/. The trends is opposite by calcium and magnesium /Table 5/.

Таблица 5. Химичен състав на царевица и зелен фасул
Table 5. Chemical composition of corn and green beans

Варианти	Zn	Cu	Mn	Fe	P	K	Ca	Mg	N
Variants	mg.kg-1				g.kg-1				
Тест култура царевица Test crop corn									
1.	25	4	50	133	2,8	29	4,3	2,5	4,8
2.	40	6	122	155	4,9	39	7,5	3,3	11,0
3.	27	3	98	147	4,1	38	6,8	3,4	11,5
4.	16	5	52	146	4,0	40	6,9	3,5	12,5
5.	21	5	28	128	3,2	34	6,9	3,7	10,8
Тест култура зелен фасул Test crop green beans									
6.	30	5	87	266	2,4	26	8,0	3,5	8,5
7.	43	6	220	522	4,5	32	38	5,3	16,0
8.	43	6	343	385	4,5	26	46	6,0	17,2
9.	32	6	115	299	4,3	30	44	5,2	17,9
10	41	5	76	410	4,1	33	41	4,5	17,0
Тест култура царевица Test crop corn									
11	23	3	40	126	1,7	28	4,2	3,1	6,2
12	36	5	116	143	4,4	38	6,8	3,4	7,3
13	34	5	95	149	4,6	40	7,1	3,4	12,5
14	34	4	51	142	3,6	40	7,6	3,5	12,7
15.	25	5	41	119	3,5	42	7,8	3,5	9,8
Тест култура зелен фасул Test crop green beans									
16.	32	12	74	501	2,8	28	27	4,2	11,6
17.	39	16	167	302	4,2	31	38	4,7	16,7
18.	45	6	177	390	4,4	29	50	6,0	27,0
19.	42	5	167	284	4,6	32	45	5,3	20,3
20.	31	7	91	268	4,2	36	41	4,9	19,2

Измерените съдържания на хранителните елементи (общ N, P и K) в зеления фасул при използване на

The measured content of food elements (common N, P and K) by green beans by using of the both meliorates is

двата мелиоранта са съпоставими с дадените оптимални стойности в Таблица 4. Изменението им по варианти има същата тенденция, както при царевицата. Калцият значително се натрупва в растителните тъкани на зеления фасул и превишава оптималните нива. Не се наблюдава ясна закономерност в натрупването на желязото при зеления фасул, след проведеното мелиориране. Получените данни са разнопосочни.

corresponding to the optimal values in the Table 4. Their changes for the variants have the same trends as by maize. Calcium considerable is concentrated in the texture of the plants of the green beans and is over the optimal content. It is not shown clear expressed regularity by the concentration of iron by the green beans after the made meliorations. The received data are diverse.

ИЗВОДИ

1. Резултатите от вегетационните опити установяват, че с повишаване нормата на варовите материали /варов шлам и пепел от изгаряне на дървесина/ се повишава и добивът при двете тествани култури в сравнение с контролите. При най-високата норма – варуване по $H_{8,2}$ се забелязва слабо понижение на добивите. При зеления фасул добивът расте по-плавно с увеличаване нормите на мелиоранта. По-високи добиви се получават при използване на пепелта от изгаряне на дървесина. Най-високи и статистически доказани добиви за двете тествани култури се получават при вариантите, мелиорирани с пепел от дървесина в норма на варуване 2 пъти по обменния алуминий.

2. Измереното съдържание на хранителни елементи в растенията (общ N, P и K) в опита с царевица е съпоставимо с дадените оптимални стойности при двата мелиоранта. Под оптималните стойности са микроелементите мед и цинк. При зеления фасул с повишаване нормата на варовия шлам и пепелта от дървесина концентрацията на хранителните елементи в листната маса се повишава. При микроелементите данните са разнопосочни. Като цяло химичната характеристика на растителната продукция от двете тествани култури установи, че измерените концентрации на хранителните елементи и тежки метали са в допус-

CONCLUSIONS

1. The results from the pot experiments determinate, that with the increase of the norm of the lime materials /lime sludge and ashes from wood/ increases the crop production by the tested plants in comparison with the control. By the highest norm – liming with $H_{8,2}$ it is shown slow decrease of the crop production. By the green beans the crop production increases slow with the increase of the norm of meliorate. Higher crop production is received by using of ashes from wood. The highest and statistical determined crop production for the both tested plants is received by variants, which are meliorated with ashes from wood in the norm of liming 2 times by the exchangeable Al.

2. The measured content of food elements by the plants (common N, P and K) in the test with maize is compared to the given optimal values by the both meliorates. Under the optimal values are the values of microelements cooper and zinc. By the green beans with the increase of the norm of lime sludge and ashes from wood, the concentration of the food elements in the plant mass increases. By microelements the data are diverse. Totally, the chemical characteristic of the crop production from the both tested plants determinate that the estimated concentration of food elements and of the heavy metals are in the limited area and can be used as a food for

тими стойности и могат да се използват като храна за животните и хората.

3. Проведените изследвания за оценка на изследваните мелиоранти калциев карбонат преципитат /варов шлам/ и пепел от изгаряне на дървесина дават основание да се определят като добри мелиоранти за коригиране на неблагоприятните свойства на кисели почви и не оказват вредно влияние върху качество и безопасността на растителната продукция.

human and animals.

3. The organized studies for estimation of the tested meliorates calcium carbonate precipitant /lime sludge/ and ashes from wood are the base for determination them as a good meliorates for correction of the unfavourable characteristics of acid soils and have no harmful influence over the quality and the safety of the crop production.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Baligar, C., K. Ritchey, J. Ahlrichs and B. Woolum**, 1991. Soil and Soil Solution Property Effects on Root Growth of aluminium Tolerant and Intolerant Wheat Cultivars. Plant-soil Interactions at Low pH, Kluwer Academic Publishers. Printed in Nederlands, pp. 245-252.
2. **Bergman, W.**, 1996. Emahrunasstorungen bei Kultroflanzen.
3. **Borisov, P., N. Dinev and V. Konov**, 1997. Influence of Various Forms Lime Materials on the Yield and Quality of Wheat. *Soil Science, Agrochemistry and Ecology*, 32(4), 40-42 (Bg).
4. **Borisov, P. and N. Dinev**, 2000. The Liming of Acidic Soils - Necessity and Prospects. *Agricultural Science*, 38(2) 43-45 (Bg).
5. **Donev, P., P. Borisov and K. Kamenov**, 1990. Soil Acidity. *Farming*, №6, 17-19 (Bg).
6. **Ganev, S.,** 1990. Contemporary Soil Chemistry. Nauka i Izkustvo. Sofia, pp. 371 (Bg).
7. **Nikova, I.**, 2008. Physico-chemical Assessment and Amelioration of Acidic Soils. Dissertation on educational and scientific degree "Doctor"(Bg).
8. **Nikolov, N., P. Borisov, A. Arsova and A. Samalieva**, 2004. Possibilities of Liming with Lime Ammonium Nitrate to Combat Soil Acidity. *Soil Science, Agrochemistry and Ecology*, XXXIX(1), 51-56 (Bg).
9. **Nikolov, N. and E. Zlatareva**, 2007. A Comparative Study of the Effect of Rock Phosphate and Superphosphate on the Yield of Wheat and Maize Grown on Acid (not Limed and Limed) and Leached Soils. Scientific reports. International Conference 13-17 May, pp. 384-389 (Bg).
10. **Taneva, M. and D. Vladeva**, 2004. Influence of Soil Reaction the Absorption of Nutrients from Plants. *Ecology and Industry*, 6, 39-40 (Bg).
11. **Toncheva, R., I. Dimitrov, D. Nikolova and M. Nenov**, 2015a. Investigation the Productivity of Maize in Different Agroecological Regions and Agrotechnical Treatments: I. Non-irrigated Conditions. *Soil Science Agrochemistry and Ecology*, XLIX(4), 55-64 (Bg).
12. **Toncheva, R., I. Dimitrov, D. Nikolova and M. Nenov**, 2015b. Investigation the Productivity of Maize in Different Agroecological Regions and Agrotechnical Treatments: II. Irrigated Conditions. *Soil Science Agrochemistry and Ecology*, XLIX(4), 65-73 (Bg).
13. **Zlatareva, E. and S. Marinova**, 2016. Assessment of Calcium Carbonate Precipitate /Lime Sludge/ and Ash Wood as Meliorants of Acid Soils. *Ecological Engineering and Environment Protection*, № 1, 10-18.

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2019, 22 (3), 234-239 ISSN 1311-0489 (Print)
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan ISSN 2367-8364 (Online)

Изследване на антигъбичната активност на биологично активни екстракти от *Ocimum americanum* L. (Лимонов босилек)

Николай Солаков[1]*, Данаил Георгиев[2], Катя Узунджалиева[3], Петър Чавдаров[3]

[1]Институт по криобиология и хранителни технологии, бул. "Черни връх"№ 53, 1407 София, България
[2]Пловдивски университет „Паисий Хилендарски", Кат. Биохимия и микробиология, ул. Костаки Пеев 29, ет.3, 4000 Пловдив, България
[3]Институт по растителни генетични ресурси, бул. „Дружба" №2, 4122 Садово, България

Study of the Antifungal Activity of Bioactive Extracts of *Ocimum americanum* L.

Nikolay Solakov[1]*, Danail Georgiev[2], Katya Uzundzhalieva[3], Petar Chavdarov[3]

[1]Institute of Cryobiology and Food Technologies, 53 Cherni Vrah Blvd., 1407 Sofia, Bulgaria
[2]Plovdiv University „Paisii Hilendarski", Dep. Of Biochemistry and Mycrobiology, 29 Kostaki Peev Str., 4000 Plovdiv, Bulgaria
[3]Institute of Plant Genetic Resources, 2 Droujba Blvd., 4122 Sadovo, Bulgaria
**E-mail: nikolay.solakov@ikht.bg*

Original scientific paper

Received: 08.04.2019 *Accepted:* 30.07.2019 *Published:* 05.09.2019

РЕЗЮМЕ

Босилекът е традиционна за нашата страна билка и подправка с широко приложение. Използва се надземната част на растението, най-често стръковете в пресен вид, като се бере по време на цъфтежа, а за сушене – преди цъфтежа. Съдържа етерични масла, гликозиди, танини, органични киселини, минерални соли.

Целта на настоящата разработка е да бъдат изследвани екстрактите, съдържащи Евгенол, получени от листа от Лимонов босилек, отгледан при *in*

SUMMARY

Basil is a traditional herb and spice for our country. The shoot of the plant is used, most often the leaves in fresh form, picked during flowering and for drying – before flowering.

Basil contains essential oils, glycosides, tannins, organic acids, mineral salts.

The aim of the present study is to investigate the extracts containing Eugenol obtained from lemongrass basil leaves grown *in vitro* and under field

vitro и при градински условия, по метода на екстракцията при ниска температура за тяхната антигъбична активност. Третирани с Евгенол са семена от житни и бобови култури, заразени с гъбни фитопатогени, изолирани в лабораторията по Фитопатология на Института по Растителни Генетични Ресурси - Садово с цел доказване на неговата практическа приложимост като биофунгицид за третиране на семена за съхранение при условията на средносрочно и дългосрочно съхранение.

Ключови думи: босилек, Евгенол, биофунгицид, антигъбична активност, гъбни фитопатогени

conditions by the low temperature extraction method for their antifungal activity. With Eugenol are treated seeds of cereals and legumes infected with fungal phytopathogens isolated in the Laboratory of Phytopathology of the Institute of Plant Genetic Resources - Sadovo in order to prove its practical applicability as a biofungicide for treatment of seeds for storage under the conditions of medium and long term storage.

Key words: basil, Eugenol, biofungicide, antifungal activity, fungal phytopathogens

УВОД

Фузариозите се причиняват от гъби от род *Fusarium*. Фузариозата по житните (*F. culmorum*) се проявява в три форми – загниване на кълновете, загниване в основите на растенията и повреди по класовете. Първите симптоми се наблюдават най-често през есента – кафяво напетняване по кълновете водещо до ранно загниване.

Фузариозата по житните има стопанско значение основно при нападение на класовете. Болестта се появява върху отделни класчета, но при благоприятни условия може да обхване отделни сектори или целия клас. Нападнатите класчета постепенно избледняват, по-рано променят зеления си цвят в бледо кремав до розов. Тези симптоми много добре се различават от здравите не заразени класове. В заболелите части на класа зърната остават спаружени и белезникави. При влажни условия по тях се образува розов плесенов налеп.

Борбата с този патоген е от особено значение за запазване на добивите при земеделските култури (Arikpo Ikpi Okoi et al., 2013). Голямо предизвикателство пред земеделската наука е прилагането на биологични методи за борба с болестите. В тази посока, в последните години, при отглеж-

INTRODUCTION

Fusarium is caused by fungi of the genus *Fusarium*. Cerebral fusariosis (*F. culmorum*) occurs in three forms – rotting germination, rotting the plant foundations and damaging the class. The first symptoms are most common in the fall – brown germination of the germs leading to early rotting.

Cereal fusariosis is a disease of economic importance mainly in the case of attack of spikes. The disease occurs on separate clusters, but under favourable conditions may extend to individual sectors or the whole spike. The attacked spikes gradually fade, earlier turning green to pale cream to pink.

These symptoms are very different from healthy, non-infected classes. In the infected parts of the class, the grains remain white and whitish. Under wet conditions, a pink mold is formed on them.

The control of this pathogen is of particular importance for maintaining crop yields (Arikpo Ikpi Okoi et al., 2013). A major challenge for agricultural science is the application of biological methods for disease control.

In this trend, in recent years, when

дане на растения в екологични ферми се търсят решения, използващи вещества, изолирани от природни източници. Такъв пример е използването на екстракти, получени от традиционно силни растения, с доказани антимикробни качества, каквито са различните видове етерично-маслени видове.

С ясно изразено противогъбично действие са тези етерично-маслени култури, които продуцират веществото Евгенол (Босилек, Карамфилово дърво, Люляк, Маслодайна роза и др.) (Neveen Helmy Abou El-Soud et al., 2015; Renata-Maria Sumalan et al., 2013).

Босилекът е традиционна за нашата страна билка и подправка с широко приложение. Използва се надземната част на растението, най-често стръковете в пресен вид, като се бере по време на цъфтежа, а за сушене – преди цъфтежа. Съдържа етерични масла, гликозиди, танини, органични киселини, минерални соли.

Целта на настоящата разработка е да бъдат изследвани екстрактите, съдържащи Евгенол, получени от листа от Лимонов босилек (*Ocimum basilicum* L.), отгледан при *in vitro* и при градински условия, по метода на екстракцията при ниска температура за тяхната антигъбична активност. Третирани с Евгенол са семена от житни и бобови култури, заразени с гъбни фитопатогени, изолирани в лабораторията по Фитопатология на Института по Растителни Генетични Ресурси - Садово с цел доказване на неговата практическа приложимост като биофунгицид за третиране на семена за съхранение при условията на средносрочно и дългосрочно съхранение.

growing plants on organic farms, solutions have been sought using substances isolated from natural sources. An example is the use of extracts obtained from traditionally strong plants with proven antimicrobial properties, such as the various types of essential oil species.

With a clearly expressed antifungal action are those essential oil plants that produce the substance Eugenol (Basil, Cloves, Lilac, Oilseed Rose, etc.) (Neveen Helmy Abou El-Soud et al., 2015; Renata-Maria Sumalan et al., 2013).

Basil is a traditional herb and spice for our country with wide application. The shoot part of the plant is used, most often the leaves in fresh form, harvested during flowering, and for drying – before flowering. They contain essential oils, glycosides, tannins, organic acids, mineral salts.

The purpose of the present work is to investigate the extracts containing Eugenol obtained from the leaves of lemon basil (*Ocimum basilicum* L.) grown in vitro and in garden conditions by the low temperature extraction method for their antifungal activity.

With Eugenol are treated cereal and leguminous seeds contaminated with fungal phytopathogens isolated in the laboratory of Phytopathology of the Institute of Plant Genetic Resources - Sadovo to prove it‘s practical applicability as a biofungicide for long-term storage conditions for medium storage.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Екстрактът, използван за третиране на гъбен патоген от род. *Fusarium* е получен чрез ензимно третиране на листна маса от *O. basilicum,* във воден разтвор с добавена 1% лимонена

MATERIAL AND METHODS

The extract used for treatment is a fungal pathogen of the genus *Fusarium,* obtained by enzymatic treatment of *O. basilicum* leaf mass in aqueous solution with 1% citric acid added, without the use

киселина, без използване на органични разтворители. Ензимното третиране е извършено при температура 18-22 ºС.

За целта на настоящият експеримент е отгледан щам от гъбния патоген *Fusarium culmorum* във фитопатологичната лаборатория на ИРГР - Садово. В лабораторията по микробиология на ПУ „П. Хилендарски“ е изследвана антимикробната активност на получения екстракт от *O. basilicum* срещу *Fuzarium culmorum*. За целта работния щам е култивиран на течна Картофено декстрозна среда при 28 градуса. Използван е агар дифузионният метод като е направен повърхностен посев върху агарова среда със 100µl посевен материал съдържащ 1.10^6 спори на милилитър определени с помощта на хомоцитометър. Използвани са 2 вида екстракти в три повторения: 1. Директно отделена проба от ензимно третирания разтвор; 2. Отделена е супернатанта от ензимно третирания разтвор, след центрофугиране при 10 000 об/ min., 7 ºС, за 10 min.

of organic solvents. The enzyme treatment was carried out at a temperature of 18-22 °C.

For the purpose of this experiment the fungal pathogen *Fusarium culmorum* was grown in the plant pathology laboratory of IRGR - Sadovo. In the Microbiology Laboratory of the “P. Hiledarski” investigated the antimicrobial activity of the resulting extract of *O. basilicum* against *Fuzarium culmorum*. For this purpose, the working strain was cultured on liquid Potato Dextrose medium at 28 degrees. The agar diffusion method was used by surface plating on agar medium with 100µl of seed containing 1.10^6 spores per milliliter determined using a homocytometer. There are 2 types of extracts used in three repetitions: 1. A directly separated sample from the enzyme-treated solution; 2. The supernatant is separated from the enzyme-treated solution after centrifugation at 10,000 rpm at 7 °C for 10 min.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Изследвана е активноста на етерично масло от Босилек *Ocimum basilicum* срещу *Fuzarium culmorum*. За целта работния щам е култивиран на течна среда Картофено декстрозна среда при 28 °С. Използван е агар дифузионният метод като е направен повърхностен посев върху агарова среда със 100 µl посевен материал съдържащ 1.10^6 спори на милилитър определени с помоща на хомоцитометър. Използвани са 2 вида екстракти, като само екстракт 1 показва видимо забавяне на развитието на използвания щам,тъй като в зона от 20 mm щама не образува спори в периода на култивиране. Всички експерименти са направени в 3 повторения.

При директно отделената проба от ензимно третирания разтвор има наличие на всички вещества, присъстващи в растението *O. basilicum*, в това

RESULTS AND DISCUSSION

The activity of *Ocimum basilicum* extract against *Fuzarium culmorum* was investigated. For this purpose, the pathogen was grown on a liquid potato dextrose medium at 28 °C.

The agar diffusion method was used by surface culture on an agar medium with 100 µl of seed containing 1.10^6 spores per milliliter determined using a homocytometer. 2 types of extracts were used, with only extract 1 showing a marked delay in the development of the strain used, since in the treated area of 20 mm the strain did not form spores during the cultivation period. All experiments were performed in 3 replicates.

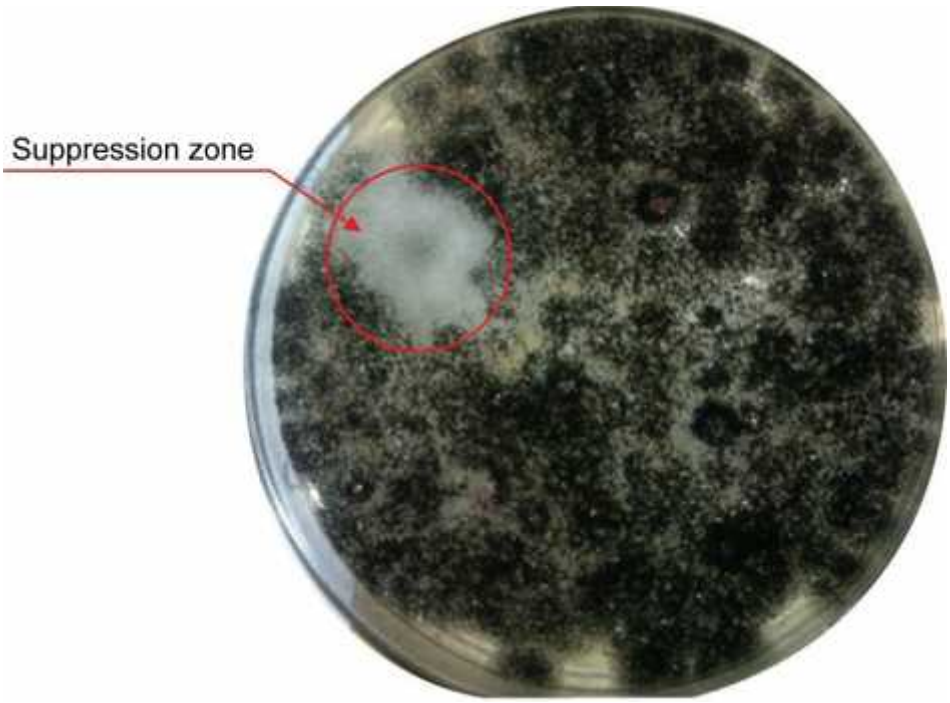
In the sample directly extracted from the enzyme-treated solution, all the substances present in the *O. basilicum* plant are present, including the essential

число и компонентите на етеричното масло, на което най-вероятно се дължи антимикробното действие.

При екстракт № 2 веществата с антимикробно действие са преминали в утайката след центрофугирането, поради което супернатантата не проявява такова действие.

oil components, which are most likely due to the antimicrobial action.

In extract № 2, the antimicrobial agents were transferred to the precipitate after centrifugation, so the supernatant did not show such action.



Фиг. 1. Резултат от третиране на *F. culmorum* с директно отделена проба от ензимно третирания разтвор
Fig. 1. Result of treatment of *F. culmorum* with a directly separated sample of the enzyme-treated solution

ИЗВОДИ

От получените резултати може да се направи извод, че при разработването на методи за приготвяне на препарати за биологична борба с болести по растенията чрез използване на метода на ензимно смилане следва да се използва целия получен екстракт, без сепариране.

От настоящия експеримент се доказва антимикробната активност на екстракт от *O. basilicum*, получен чрез ензимно смилане срещу патогена *F. culmorum*.

CONCLUSIONS

From the results obtained, it can be concluded that in the development of methods for the preparation of biological preparations for plant diseases using the method of enzymatic digestion, the whole extract obtained, without separation, should be used.

The present experiment demonstrates the antimicrobial activity of an extract of *O. basilicum* obtained by enzymatic digestion against the pathogen *F. culmorum*.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Arikpo Ikpi Okoi, Samuel Effiong Udo, Moses Eso Eka, Kingsley Hovana Enyi-Idoh, Nsor O. Alobi and Magdalene Obi-Abang**, 2013. Antifungal Activity of Extracts of Scent Leaf (Ocimum gratissimum) and Alligator Pepper (Aframomum melegueta) on the Post Harvest Decay of Carrot in Calabar, Nigeria. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 3 (14), 26-30.

2. **Neveen Helmy Abou El-Soud, Mohamed Deabes, Lamia Abou El-Kassem and Mona Khalil**, 2015. Chemical Composition and Antifungal Activity of *Ocimum basilicum* L. Essential Oil. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*. 2015 Sep 15, 3 (3), 374-379.

3. **Renata-Maria Sumalan, Ersilia Alexa and Mariana-Atena Poiana**, 2013. Assessment of Inhibitory Potential of Essential Oils on Natural Mycoflora and Fusarium mycotoxins Production in Wheat. *Chem Cent J.*, 7: 32.