



БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА
НАУКИТЕ



ИНСТИТУТ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ
„СТЕФАН АНГЕЛОВ“

Лиляна Василева Начева

**Биодеградация на ароматни и алифатни ксенобиотици от
свободни и имобилизирани бактериални клетки**

АВТОРЕФЕРАТ

На дисертационен труд за присъждане на образователна и научна
степен „Доктор“

Професионално направление 4.3 „Биологически науки“

Научна специалност 01.06.12 „Микробиология“

Научен ръководител: доц. д-р Людмила Кабаиванова

София, 2022 г.



БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА
НАУКИТЕ



ИНСТИТУТ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ
„СТЕФАН АНГЕЛОВ“

Лиляна Василева Начева

**Биодеградация на ароматни и алифатни ксенобиотици от
свободни и имобилизирани бактериални клетки**

АВТОРЕФЕРАТ

На дисертационен труд за присъждане на образователна и научна
степен „Доктор“

Професионално направление 4.3 „Биологически науки“

Научна специалност 01.06.12 „Микробиология“

Научен ръководител: **доц. д-р Людмила Кабаиванова**

Научно жури: проф. Пенка Петрова, дн
доц. д-р Златка Алексиева
проф. Димитър Кадийски, дн
проф. д-р Светлозара Петкова
доц. д-р Нина Цветкова

София, 2022 г.

Дисертационният труд обхваща 105 страници, съдържа 7 схеми, 46 фигури и 5 таблици. Библиографската справка включва 181 литературни източника. Номерацията на фигурите в автореферата не съответства на номерацията в пълния текст на дисертацията.

Изследванията, свързани с дисертационния труд са проведени в Лаборатория „Биоремедиация и биогорива“ в Институт по микробиология "Стефан „Ангелов“- БАН.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на заседание на Националния научен семинар по „Приложна микробиология и микробни биотехнологии“ на 17.02.2022 г. в Институт по микробиология "Стефан „Ангелов“- БАН, ул. „Акад. Г. Бончев“ бл. 26, София.

Материалите по защитата са на разположение в кабинета на научния секретар на Институт по микробиология "Стефан „Ангелов“- БАН, ул. „Акад. Г. Бончев“ бл. 26, София.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на открито заседание пред научно жури на2022 г. от в заседателната зала на Институт по микробиология "Стефан „Ангелов“- БАН, ул. „Акад. Г. Бончев“ бл. 26, София.

Използвани съкращения

% - процент

°C - градус по Целзий

µm - микрометър

EI – индекс на емулсификация

g - грам

in situ – на място

l - литър

mg - милиграм

ml - милилитър

mNm⁻¹ – милинютън на метър

nm - нанометър

OD (optical density) - оптичната плътност

PCR – полимеразна верижна реакция

SEM - сканиращ електронен микроскоп

v - обем

AAm - акриламид

ДНК - дезоксирибонуклеинова киселина

НИПАМ - n-изопропилакриламид

РААм - полиакриламид

РЕО - полиетилен оксид

pPHK (rRNA) - рибозомна рибонуклеинова киселина

ХПЦ – хидроксипропилцелулоза

1. Увод

С развитието на съвременната цивилизация, пред човечеството възниква проблемът за опазването на околната среда. Днес, поради активната битова, промишлена и селскостопанска дейност на човека, въпросът придобива все по-голяма значимост. Човекът нанася вреда и на самия себе си, използвайки неразумно природните ресурси и правейки ги непригодни за живота на растенията, животните и микроорганизмите.

Един от най-надеждните подходи за разрешаване на тези проблеми е използването на естествените способности на различни видове микроорганизми за разграждане и детоксикация на ксенобиотични вещества. Това налага изучаването им и прилагането на натрупаните знания за откриване на високо ефективни щамове, способни да разграждат така нежеланите замърсители на природата, които съответно оказват неблагоприятното си влияние и върху човешкото здраве и живот.

Установено е, че на ден се употребяват повече от 65 000 вида силно токсични вещества, което без съмнение представлява сериозна опасност в екологичен аспект.

Терминът ксенобиотик произхожда от латинските думи *xeno* (чужд) и *biota* (жива материя) и означава нещо, което е чуждо по структура на биологично синтезираните съединения. Ксенобиотиците са изкуствено синтезирани съединения с химична структура, с която микроорганизмите не са се срещали в процеса на биологичната еволюция.

Особено ценни и в екологично, и в икономическо отношение са биотехнологичните подходи за детоксикация на води и почви. За пречистване на отпадните води се използват най-често биологични методи, които се основават на способността на микроорганизмите да разграждат различни органични вещества, в т.ч. и вещества с токсично действие.

2. Цел и задачи

Цел на настоящия дисертационен труд е да се проучи способността на микробни видове в свободна и имобилизирана форма за биодеградация на ароматни и алифатни ксенобиотици.

Във връзка с така поставената цел се набеязаха следните задачи:

1. Сравняване на фенол разграждащата активност на избрани бактерии от родовете: *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* и др. и евентуалното им участие в биоремедиация на води и почви след оптимизиране условията на процеса.
2. Изследване на адаптационните способности на избрани бактериални щамове в условия на полунепрекъснат процес при многократно подаване на ксенобиотик.
3. Определяне възможностите за имобилизация и избор на най-ефективния подход.
4. Изпитване възможностите на подбраните имобилизирани препарати за многократно използване и оценка на проследяваната активност.
5. Изследване потенциала на избраните щамове за едновременно разграждане на алифатни и ароматни (хидрофобни и хидрофилни) съединения при участие на свободни и имобилизирани клетки.
6. Проследяване активността им за продукция на биосърфактанти и ролята им в процесите на биодеградация.

3. Материали и методи

3.1. Микроорганизми и условия на култивиране

Щамове *Rhodococcus wratislawiensis* BN38, *Nocardia farcinica* BN26 и *Micrococcus luteus* BN56 бяха избрани след изолиране от замърсена с нефтопродукти почва. Извършвана е адаптивна селекция върху хранителна среда. Като единствен въглероден източник са използвани различни алифатни и ароматни въглеводороди. Инокулумът се приготвя след 5-дневна инкубация на твърда минерална среда в еднолитрови колби на Ру при температура 28°C. Получената биомаса се ресуспендира в течна хранителна среда до определена оптична плътност. Култивирането се извършва в 500 ml колби, съдържащи 100 ml хранителна среда и фенол или съответно n-хексадекан в различни изследвани концентрации на клатачен апарат при 120 оборота и 28°C .

За изследване на биодеградационния процес е използван методът на полунепрекъснато култивиране, при който се осъществява многократно подаване на фенол и/или n-хексадекан в хранителната среда.

Когато е разграден, Всеки нов цикъл започва след разграждане на ксенобиотика и добавяне на ново количество в изследваната концентрация.

Растежът на културата е определян чрез измерване на оптичната плътност при 610 nm (OD_{610}) на Spekol 11 (Carl Zeiss, Jena).

3.2. Матрици за имобилизация

Бяха синтезирани криогелове от смес на хидроксипропилцелулоза (ХПЦ) и n-изопропилакриламид (НИПАМ) в съотношение 1:1, криогел, синтезиран от прекурсори на полиакриламид или акриламид с висока моларна маса, както и криогел на основата на полиетилен оксид (PEO) и полиакриламид (РААм).

3.3. Имобилизация на микробни клетки в криогелни матрици

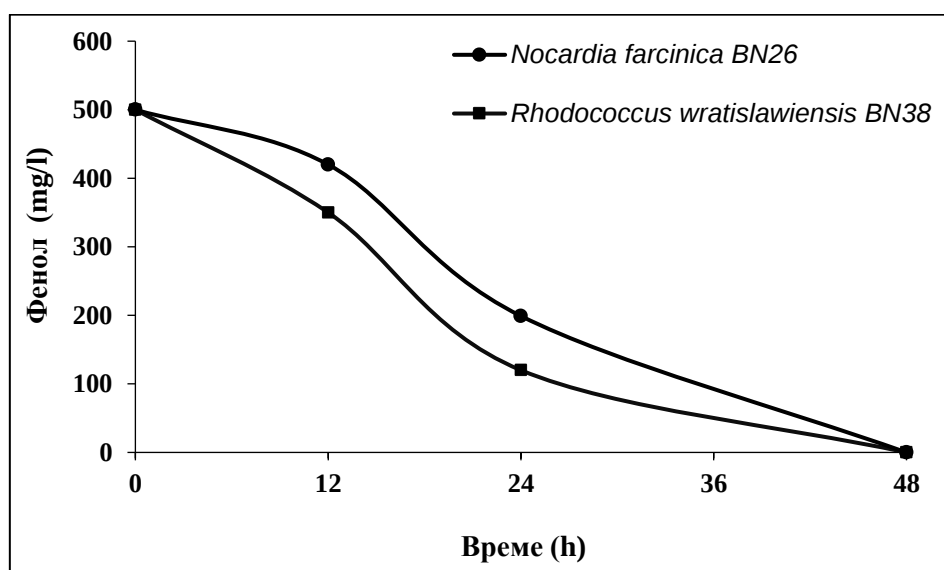
Използвана беше 7 ml микробна суспензия ($OD_{610\text{ nm}}=10.0$) от изследваните щамове и прибавена към 6 броя диска от криогела.

Полунепрекъснатите биодеградационни процеси протичаха като след разграждането на фенола, преди всеки нов цикъл, хранителната среда беше отливана от колбата, а матрицата, заедно с клетките е промивана двукратно. Свежа хранителна среда беше добавяна до работния обем от 100 ml и фенол или съответен ксенобиотик в изследваната концентрация.

4. Резултати

4.1. Фенолна биодеградация

Подбрани бяха щамове от родовете *Micrococcus*, *Rhodococcus*, *Nocardia* и *Pseudomonas* с катаболитна активност спрямо някои алифатни въглеводороди. Експериментите започнахме с *Rhodococcus wratislawiensis* BN38 и *Nocardia farcinica* BN26.



Фигура 1. Динамика на фенолната биодеградация от щамове *Nocardia farcinica* BN26 и *Rhodococcus wratislawiensis* BN38, представени като средноаритметични стойности ($\text{хср.} \pm \sigma$)

Растеж на твърда хранителна среда с фенол с концентрация 500 mg/l показаха щамовете *Rhodococcus wratislawiensis* BN38 и *Nocardia farcinica* BN26.

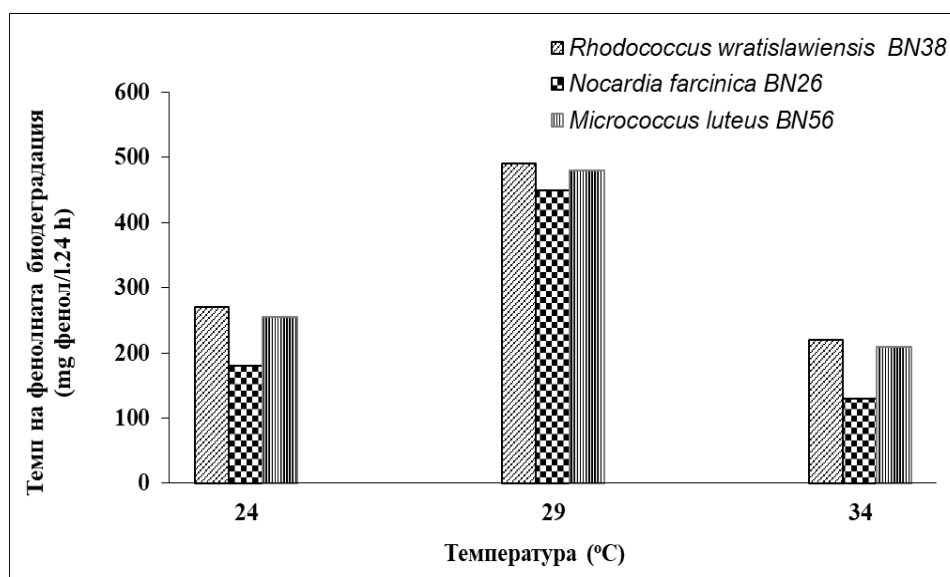
Най-активна биодеградация на течна хранителна среда с фенол се наблюдава при *Rhodococcus wratislawiensis* щам BN38. Доказани бяха бързо

протичащи процеси при стартова концентрация от 500 mg/l. Фенолът беше напълно катаболизиран за период от 48 часа. *Nocardia farcinica* BN26 също доказва способността си за бърза фенолна биодеградация при начална концентрация 500 mg/l.

От представените резултати може да се приеме, че подобрените щамове са активни биодеграданти на фенол, особено *Rhodococcus wratislawiensis* щам BN38.

4.2. Оптимизиране на условията за провеждане на фенолната биодеградация

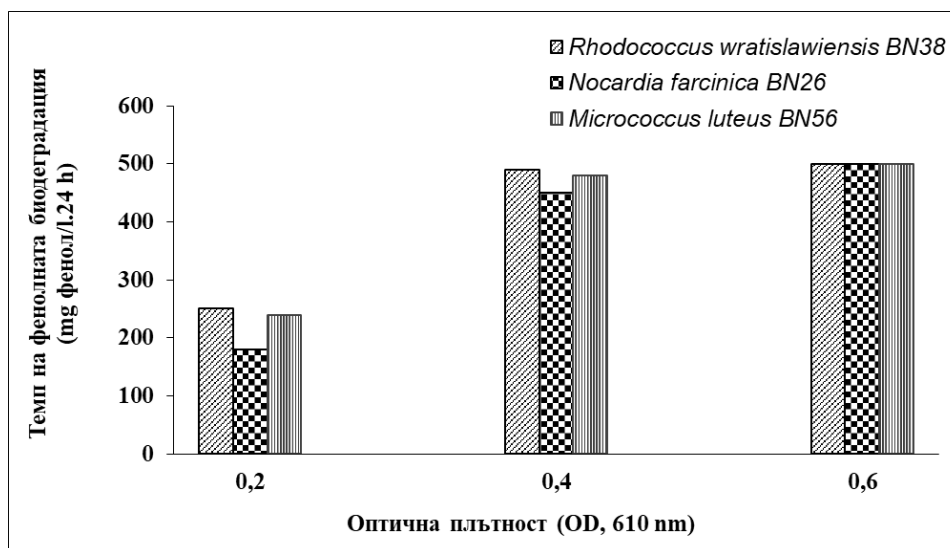
Изследван е десет градусов интервал (24°C - 34°C) за определяне на оптималната температура (Фигура 2). Опитите са провеждани при 24°C , 29°C и 34°C. Сравнявани са щамовете *Rhodococcus wratislawiensis* BN38, *Nocardia farcinica* BN26 и *Micrococcus luteus* BN56. Най-високите темпове на фенолната биодеградация се наблюдават при 29°C и при трите изследвани щамове – 450-500 mg/l е разграденият фенол за двудневния период.



Фигура 2. Влияние на температурата върху темпа на фенолната биодеградация, представени като средноаритметични стойности ($\bar{x} \pm \sigma$)

Изследвано беше и влиянието на първоначалната (стартова) микробна плътност върху темпа на изследваните процеси като са използвани три различни

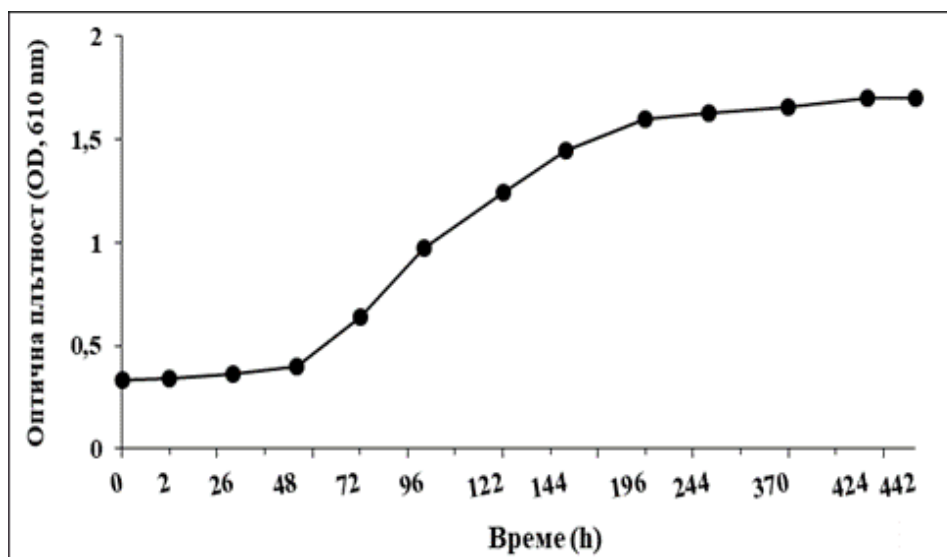
инокулационни стойности: 0,2, 0,4 и 0,6 оптична плътност (OD 610 nm). Високи нива на биодеградация се достигат при инокулационен старт 0,4 OD 610 nm. При по-висока начална плътност не се наблюдава интензифициране на фенолната деградация (Фигура 3).



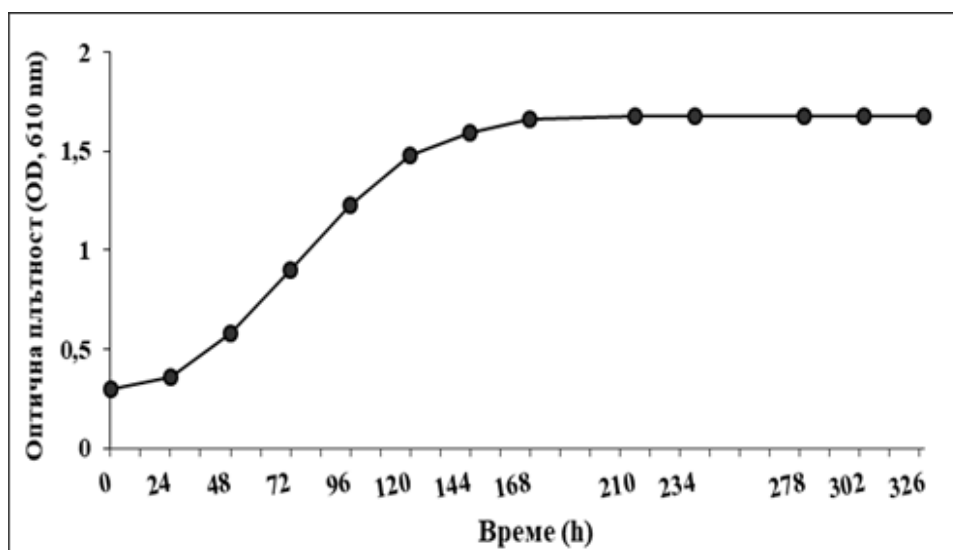
Фигура 3. Влияние на началното количество инокулационен материал върху темпа на фенолната биодеградация, представени като средноаритметични стойности ($\text{хср.} \pm \sigma$)

4.3. Изследване на адаптационния потенциал на *Rhodococcus wratislawiensis* BN38

След кратък лаг-период започва логаритмичната фаза, чиято продължителност е около 5 дни. При шестото подаване на фенол в концентрация 500 mg/l, т.е. шести цикъл, се достига до стационарна фаза в растежа, продължаваща до забавянето на катаболитните процеси (Фигура 4).



Фигура 4. Растежна крива на неадаптиран щам *Rhodococcus wratislawiensis* BN38 в условия на полунепрекъснато култивиране, представени като средноаритметични стойности ($\text{хср.} \pm \sigma$)

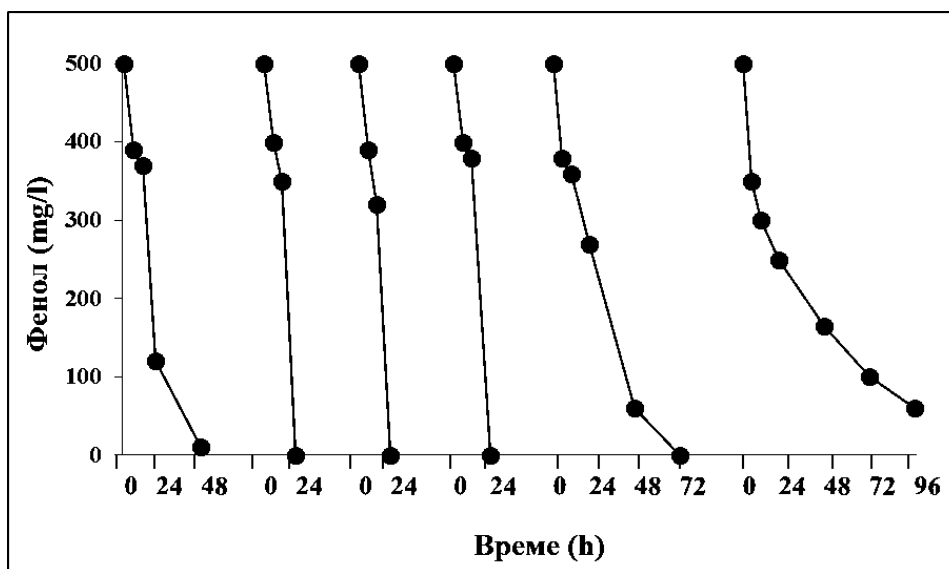


Фигура 5. Растежна крива на десетократно препасажирен щам *Rhodococcus wratislawiensis* BN38 в условия на полунепрекъснато култивиране, представени като средноаритметични стойности ($\text{хср.} \pm \sigma$)

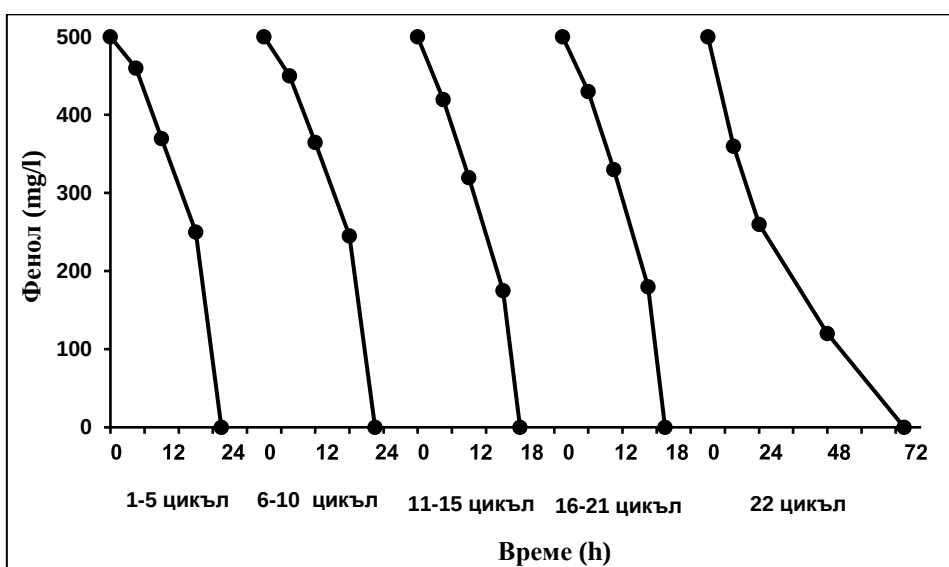
Отново се наблюдава кратък лаг-период и логаритмична фаза, продължаваща до шестия цикъл (Фигура 5). Същественото различие при десетократно адаптираните клетки е, че шест цикъла протичат по време на стационарната фаза в развитието на културата, докато в първия случай

настъпването ѝ е съпроводено със значително понижение на темпа на биодеградиационния процес.

4.4. Динамика на фенолната биодеградация след адаптация на *Rhodococcus wratislawiensis* BN38



Фигура 6. Динамика на фенолната биодеградация от неадаптиран щам *Rhodococcus wratislawiensis* BN38 в условия на полунепрекъснато култивиране, представени като средноаритметични стойности ($\bar{x} \pm \sigma$)

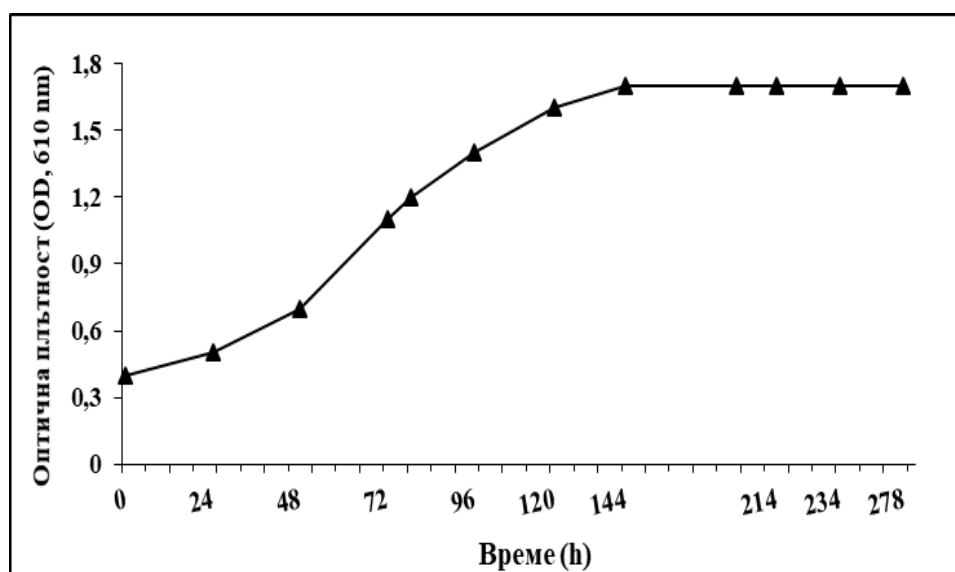


Фигура 7. Динамика на фенолната биодеградация от десетократно препасажирен щам *Rhodococcus wratislawiensis* BN38 в условия на полунепрекъснато култивиране, представени като средноаритметични стойности ($\bar{x} \pm \sigma$)

Фенолната биодеградация се активизира по време на втория, третия и четвъртия цикъл, когато наличният фенол е разграден за 24 часа. При следващо подаване на фенол в средата (пети, шести цикъл) интензивността намалява и времето за пълно разграждане се увеличава до три - четири дни (Фигура 6).

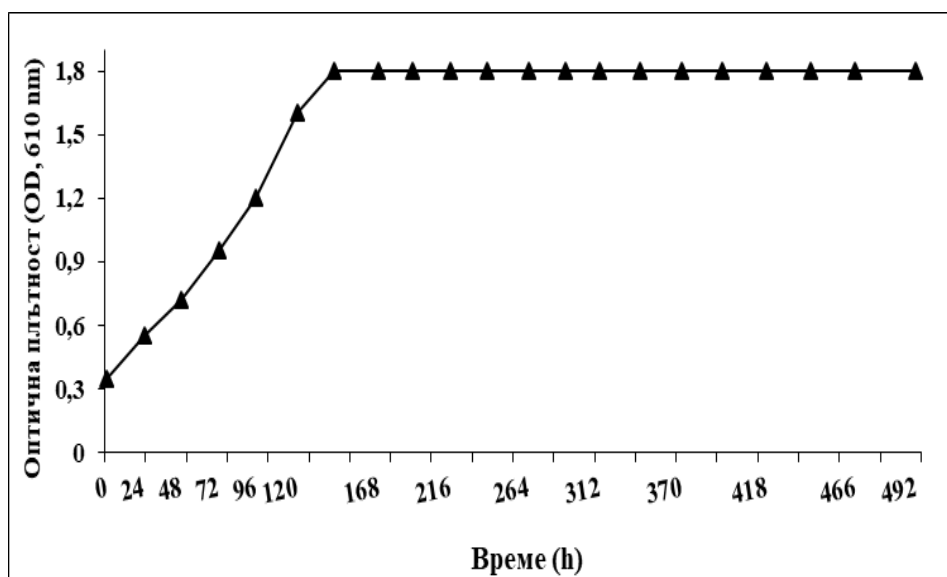
Скоростта на процеса е постоянна за първите десет цикъла: - 24-часов период, необходим за пълното разграждане на ксенобиотика (Фигура 7). Известно увеличаване на темпа се наблюдава през следващите единайсет цикъла - фенолната биодеградация е завършена напълно за 18 часа. Тези два и два цикъла с общо количество прибавен фенол 11g/l демонстрират не само високия темп на разградните процеси, но и устойчивост спрямо ксенобиотика.

4.5. Изследване на адаптационния потенциал на *Nocardia farcinica* BN26



Фигура 8. Растежна крива на неадаптиран щам *Nocardia farcinica* BN26 в условия на полунепрекъснато култивиране, представени като средноаритметични стойности ($\bar{x} \pm \sigma$)

След кратък лаг-период настъпва логаритмична фаза с продължителност четири дни. След петия цикъл се стига до стационарна фаза в растежа и до намаляване темпа на биодеградация (Фигура 8).



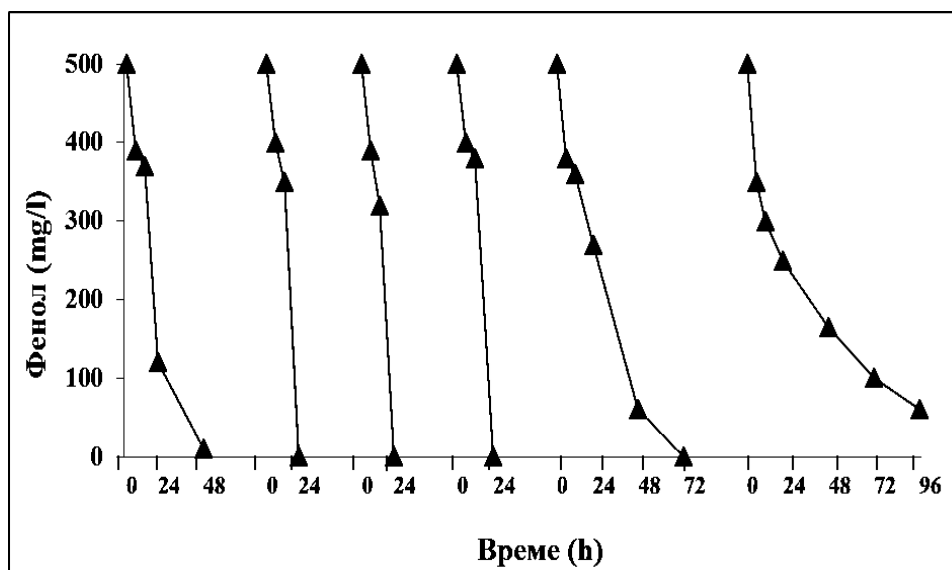
Фигура 9. Растежна крива на десетократно препасажиран щам *Nocardia farcinica* BN26 в условия на полунепрекъснато култивиране, представени като средноаритметични стойности ($\text{хср.} \pm \sigma$)

В растежа на микробната култура (Фигура 9) се наблюдава кратък лаг-период и логаритмична фаза, продължаваща до петия цикъл. По време на стационарната фаза протичат повече от десет цикъла на биодеградационния процес.

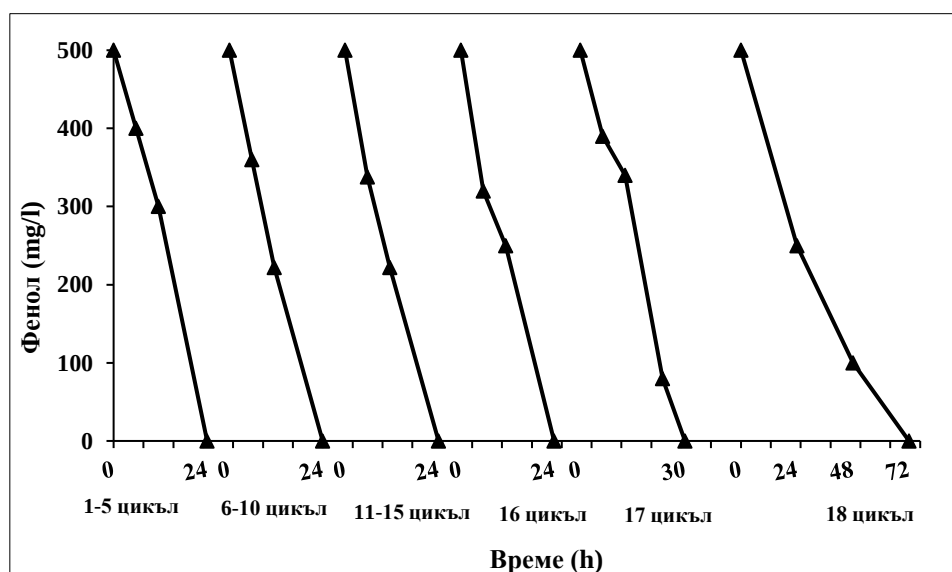
4.6. Динамика на фенолната биодеградация след адаптация на *Nocardia farcinica* BN26

В опитите с неадаптирани клетки изследваните процеси се активизират по време на втория, третия и четвъртия цикъл. При следващо подаване на фенол интензивността намалява значително (Фигура 10).

Отново най-високият биодеградационен потенциал се наблюдава при клетки, предварително препосявани десетократно на среди с фенол (Фигура 11). И в този изследван случай внасяният в средата ксенобиотик е напълно разграден.



Фигура 10. Динамика на фенолната биодegradация от неадаптиран щам *Nocardia farcinica* BN26 в условия на полунепрекъснато култивиране, представени като средноаритметични стойности ($\bar{x} \pm \sigma$)

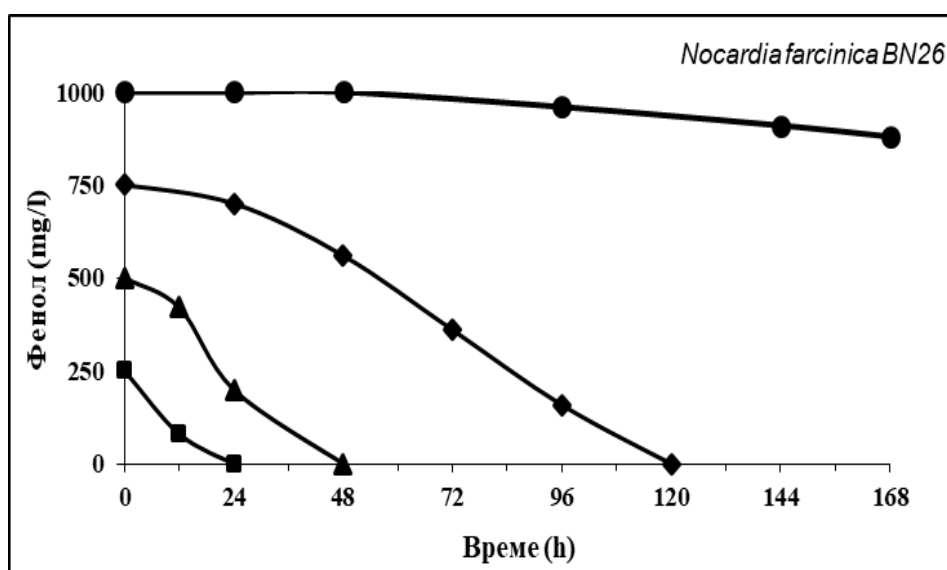


Фигура 11. Динамика на фенолната биодegradация от десетократно препасажирен щам *Nocardia farcinica* BN26 в условия на полунепрекъснато култивиране, представени като средноаритметични стойности ($\bar{x} \pm \sigma$)

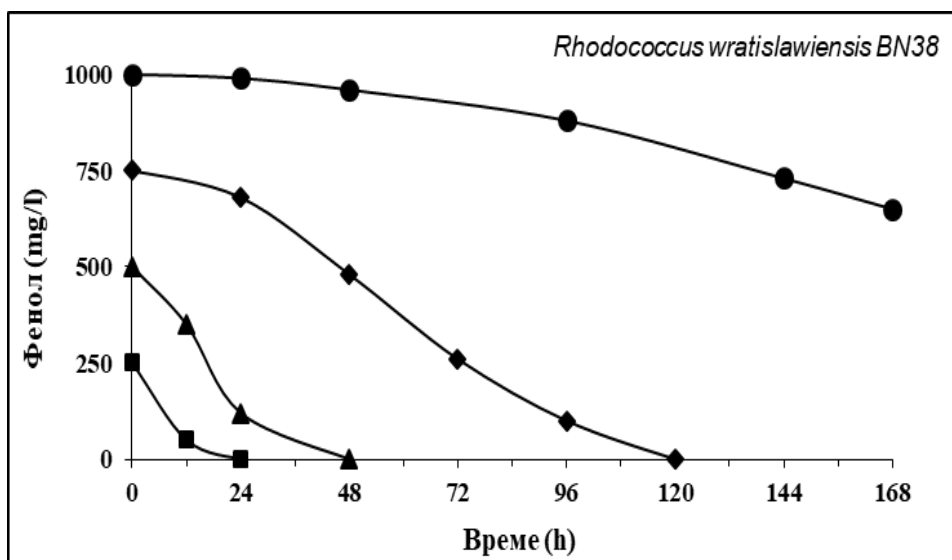
4.7. Сравнително проследяване на биодegradационните процеси при постепенно увеличаване на началната концентрация на фенол

Катаболитната активност на изследваните щамове при нарастващи концентрации фенол (250, 500, 750 и 1000 mg/l) е доказана. С ниската

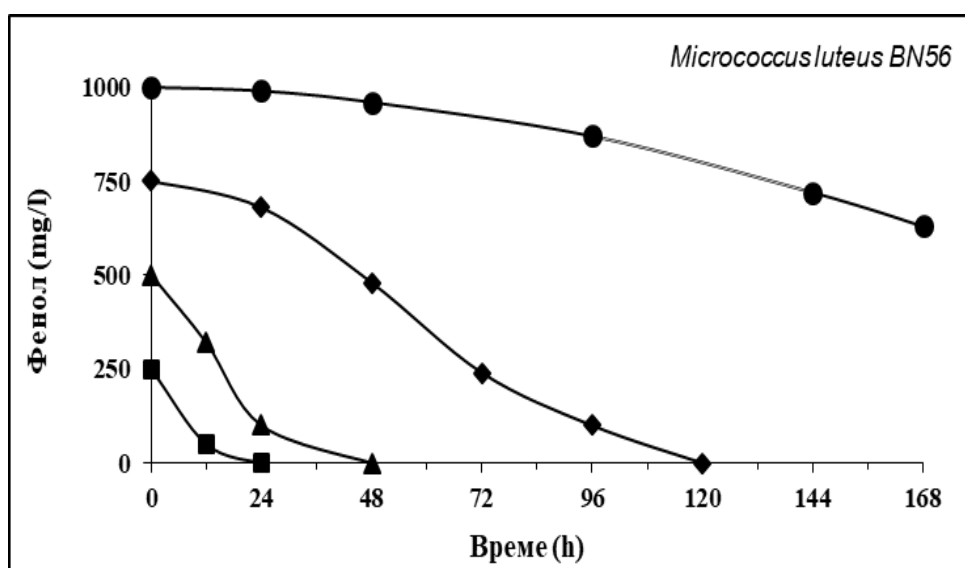
концентрация биоразграждането беше по-бързо и след 48 часа цялото количество беше изчерпано. Когато се добавят 1000 mg/l фенол, процесът значително се забавя поради инхибиране. Наблюдава се инхибиране и на растежа. От представените резултати до тук ясно личи, че клетките на *Rhodococcus wratislawiensis* BN38 (Фигура 13) и *Micrococcus luteus* BN56 (Фигура 14), преодоляват в по-голяма степен инхибиторния ефект от високата фенолна концентрация. Активността им продължава осем цикъла, независимо от много продължителните първоначални процеси, докато клетките на *Nocardia farcinica* BN26 (Фигура 12) са подложени на инхибиращия ефект на ксенобиотика и като растеж, и като катаболитна активност.



Фигура 12. Динамика на фенолната деградация от *Nocardia farcinica* BN26, представени като средноаритметични стойности ($\bar{x} \pm \sigma$)

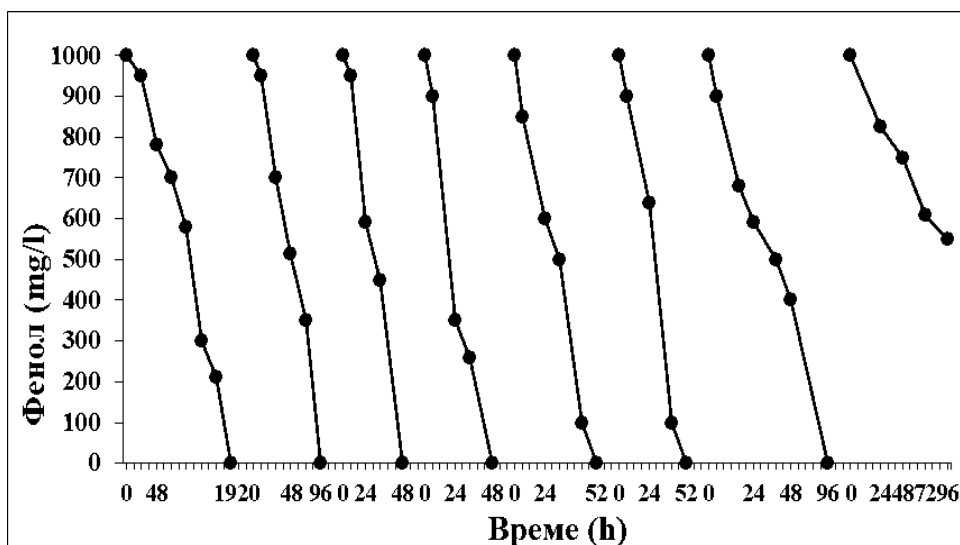


Фигура 13. Динамика на фенолната деградация от *Rhodococcus wratislawiensis* BN38, представени като средноаритметични стойности ($\text{хср.} \pm \sigma$)

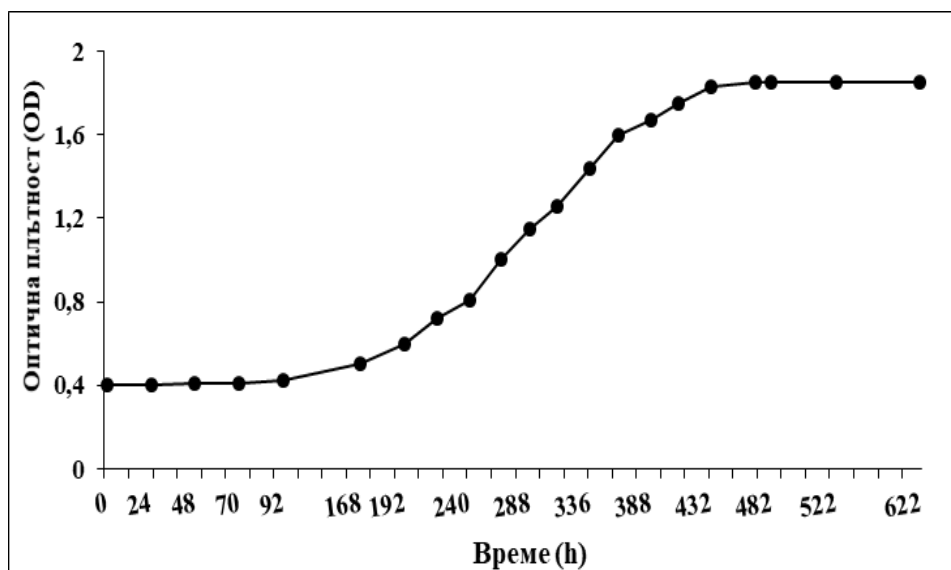


Фигура 14. Динамика на фенолната деградация от *Micrococcus luteus* BN56, представени като средноаритметични стойности ($\text{хср.} \pm \sigma$)

4.8. Проследяване на биодеградиационните процеси от *Rhodococcus wratislawiensis* BN38 при увеличена началната концентрация на фенол



Фигура 15. Динамика на фенолната биодеградация от адаптиран щам *Rhodococcus wratislawiensis* BN38 в условия на полунепрекъснато култивиране, представени като средноаритметични стойности ($\bar{x} \pm \sigma$)



Фигура 16. Растежна крива на адаптиран щам *Rhodococcus wratislawiensis* BN38 в условия на полунепрекъснато култивиране, представени като средноаритметични стойности ($\bar{x} \pm \sigma$)

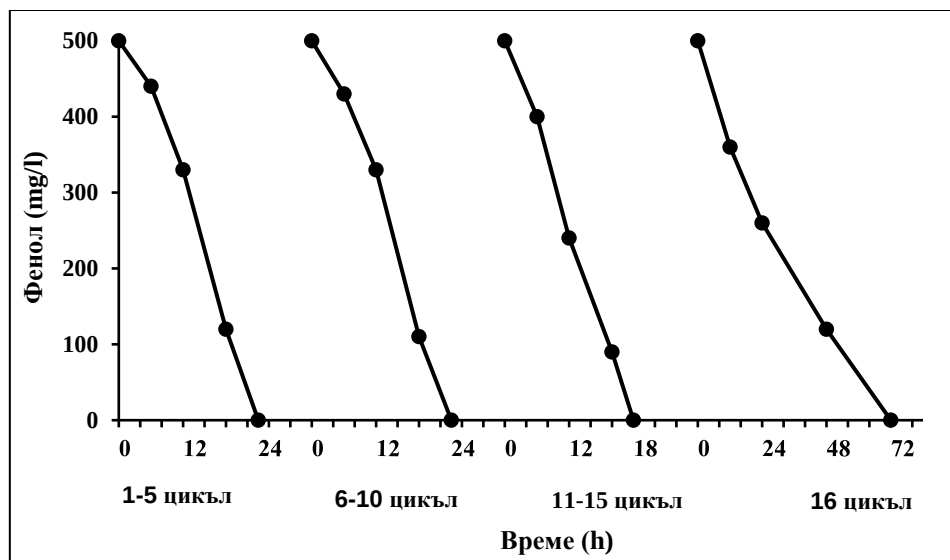
В началото на всеки цикъл е подаван фенол в средата в концентрация 1000 mg/l. След пълното му изчерпване следва ново прибавяне на ксенобиотика в

същото количество. Използван е инокулационен материал от адаптирани клетки на *Rhodococcus wratislawiensis* BN38. Разграждането на фенола във висока концентрация е забавено, особено при първоначалното му подаване - 192 часа. Процесът продължава 8 дни до пълното изчерпване на ксенобиотика. Известно увеличаване на скоростта на биодеградация се наблюдава през трети, четвърти, пети и шести цикъл. Внасяният фенол е разграждан за период от 48-52 часа. При седми и осми цикъл времето, необходимо за изчерпване на токсичното вещество, се увеличава значително и фенолът не е разграден до край. Общото количество прибавен фенол достига 8 g/l, което е достатъчно за инхибиране на катаболитната активност на клетките. Високата фенолна концентрация оказва инхибиращ ефект и върху растежа на микробната култура, който е видимо забавен в началния момент. Лаг-фазата се увеличава и има продължителност 5 дни. Логаритмичната фаза започва заедно с втория и продължава до края на петия цикъл и има силно удължен период от десет дни. Стационарната фаза настъпва заедно с шестия и продължава до осмия цикъл.

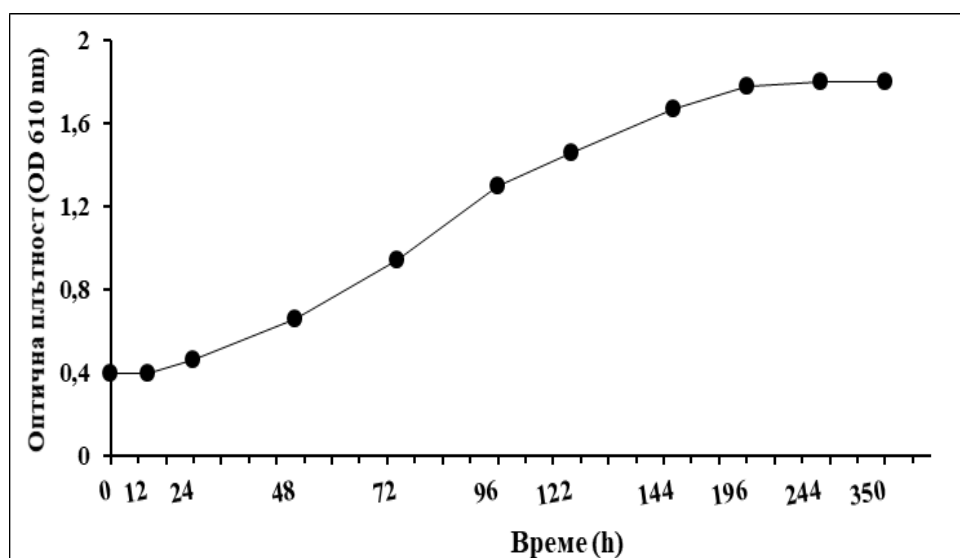
4.9. Биодеградация при наличие на ароматни и алифатни токсични вещества в средата с десетократно пасажирани клетки на щам *Rhodococcus wratislawiensis* BN38

По време на цели шестнайсет цикъла биодеградацията на ароматния ксенобиотик в присъствие на n-хексадекан протича с високи темпове и след 18-24 часа остатъчни количества не са доказани. Общото разградено количество фенол е 8 g/l. При сравнение с процесите, протичащи само в присъствие на фенол, се вижда, че адаптираните микробни клетки катаболизират фенола по време на дваайсет и два цикъла, т.е. общото количество разграден ароматен ксенобиотик е 11 g/l. Потенциалът за биодеградация на само един ксенобиотик е малко по-голям от този при процесите, протичащи в присъствието на двата ксенобиотика заедно, но в този случай имаме разграждане на два ксенобиотика едновременно. Растежът на клетките на *Rhodococcus wratislawiensis* BN38 в присъствие на хидрофилни и

хидрофобни съединения включва кратък лаг- период и логаритмична фаза, продължаваща до петото подаване на фенол и п-хексадекан. Следващите единайсет цикъла са протичали през стационарната фаза.



Фигура 17. Едновременна биодegradация на фенол и п-хексадекан от адаптиран щам *Rhodococcus wratislawiensis* BN38 в условия на полунепрекъснато култивиране, представени като средноаритметични стойности ($\text{хср.} \pm \sigma$)

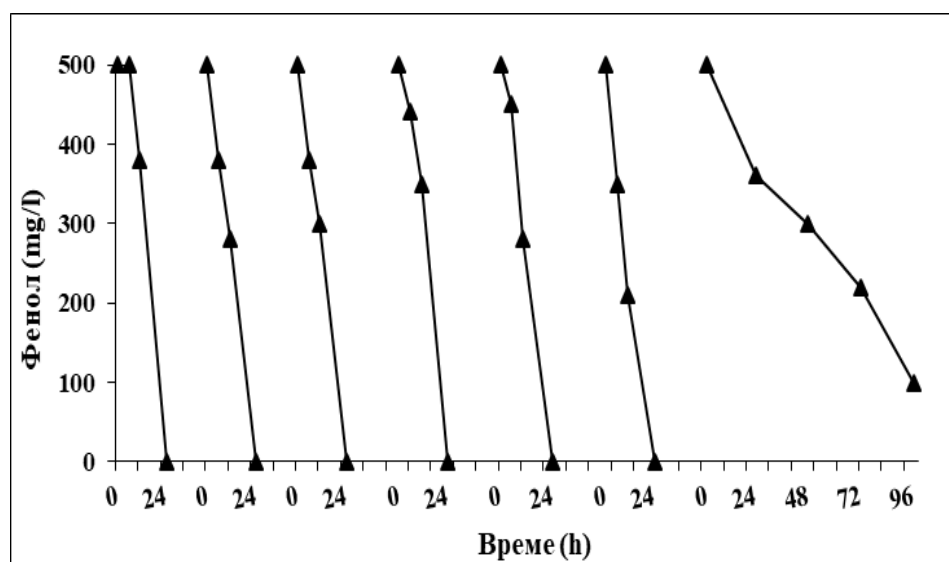


Фигура 18. Растежна крива на адаптиран щам *Rhodococcus wratislawiensis* BN38 в присъствие на фенол и п-хексадекан в условия на полунепрекъснато култивиране, представени като средноаритметични стойности ($\text{хср.} \pm \sigma$)

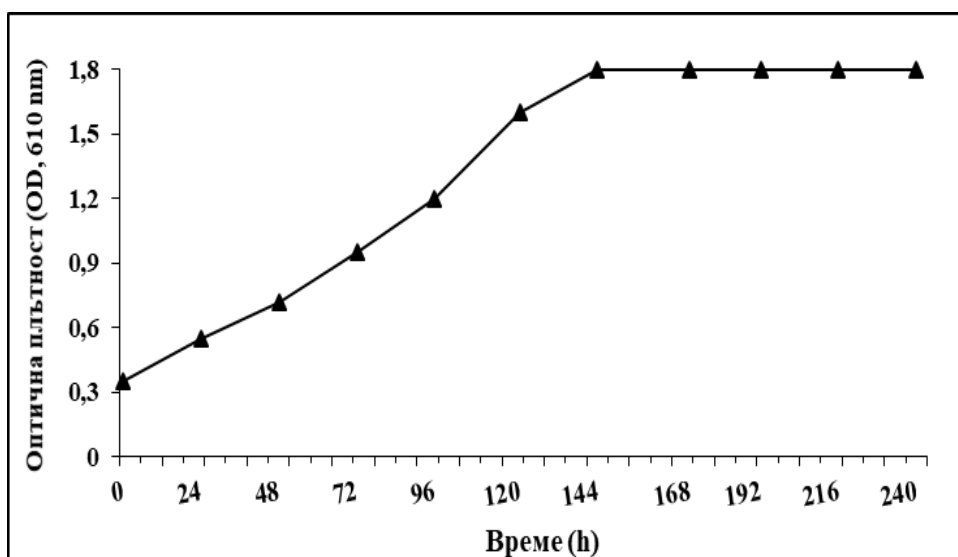
4.10. Биодegradация при наличие на ароматни и алифатни токсични вещества в средата с десетократно пасажирани клетки на щам *Nocardia farcinica* BN26

Едновременната биодegradация на ароматен и алифатен ксенобиотик, извършвана от клетки на *Nocardia farcinica* BN26, е по-слабо активна в сравнение с осъществяваната с клетки на *Rhodococcus wratislawiensis* BN38. Пълното изчерпване на внасяния в средата фенол се осъществява за 18-24 часа в продължение само на седем активни цикъла. Растежът на клетки на *Nocardia farcinica* BN26 в присъствие на два ксенобиотика обхваща лаг- периода и логаритмичната фаза, което продължава до петия цикъл. В началото на стационарната фаза интензивността на процесите е намалена значително.

Количеството разграден фенол от клетки на *Rhodococcus wratislawiensis* BN38 е 2.3 пъти повече в сравнение с тези на *Nocardia farcinica* BN26, при която инхибиращият ефект настъпва много по-рано. Количеството разграден п-хексадекан от клетките на *Rhodococcus wratislawiensis* BN38 е 4.8 пъти повече от разградения от клетките на *Nocardia farcinica* BN26.



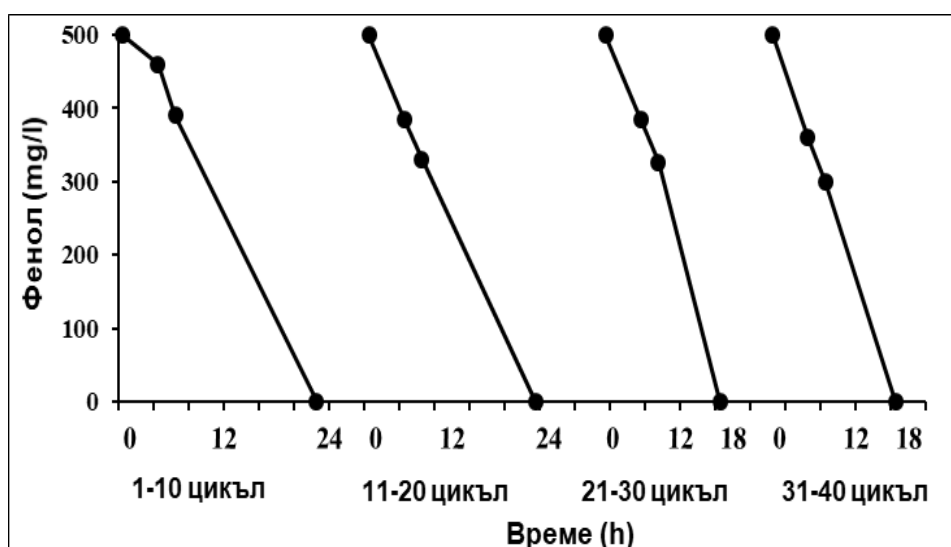
Фигура 19. Едновременна биодegradация на фенол и п-хексадекан от адаптиран щам *Nocardia farcinica* BN26 в условия на полунепрекъснато култивиране, представени като средноаритметични стойности ($\bar{x} \pm \sigma$)



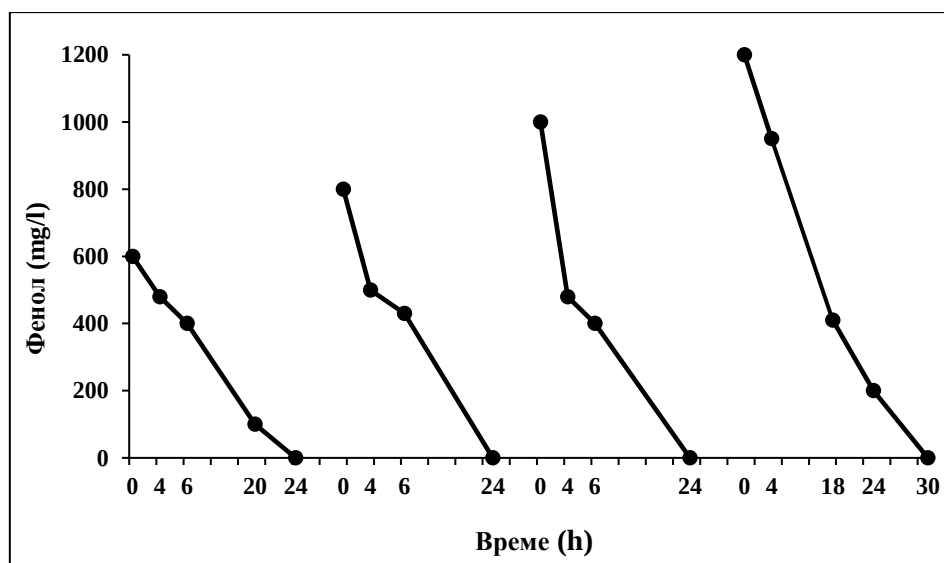
Фигура 20. Растежна крива на адаптиран щам *Nocardia farcinica* BN26 в присъствие на фенол и п-хексадекан в условия на полунепрекъснато култивиране, представени като средноаритметични стойности ($\text{хср.} \pm \sigma$)

4.11. Биодеградация на фенол от имобилизирани микробни клетки на *Rhodococcus wratislawiensis* BN38

Криогелове бяха получени от смес на хидроксипропилцелулоза (ХПЦ) и N-изопропилакриламид (НИПАМ) в съотношение 1:1.



Фигура 21. Процеси на полунепрекъсната биодеградация на фенол от имобилизирани клетки на *Rhodococcus wratislawiensis* BN38, представени като средноаритметични стойности ($\text{хср.} \pm \sigma$) на остатъчния фенол за всеки десет цикъла.



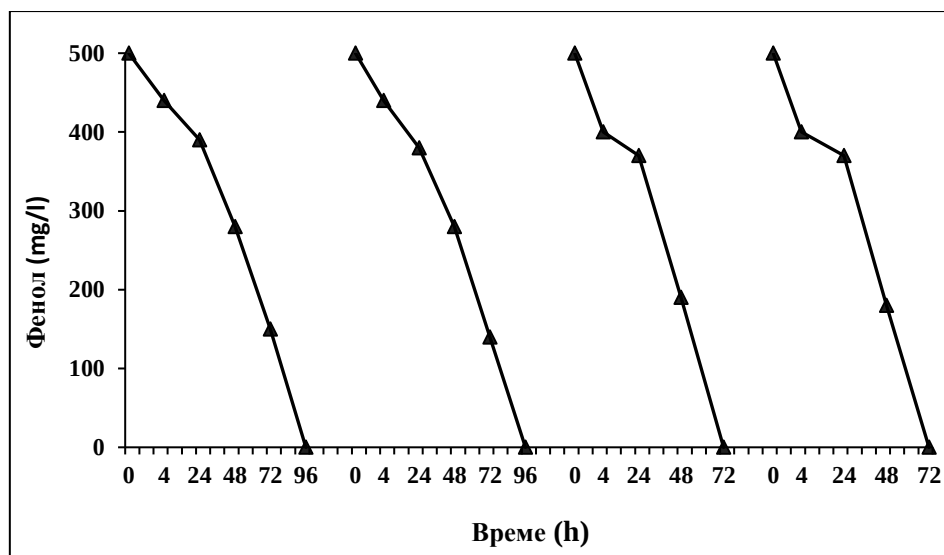
Фигура 22. Процеси на полунепрекъсната биодеградация на фенол от имобилизирани клетки на *Rhodococcus wratislawiensis* BN38 протичащи при нарастваща начална концентрация на фенол при всеки старт, представени като средноаритметични стойности ($\bar{x} \pm \sigma$)

Наблюдава се много активна биодеградация на фенол още от първото му подаване. В продължение на цели четиридесет цикъла катаболитният потенциал на клетките остава много активен. Получихме доказателство, че избраният метод за имобилизация е ефикасен за един продължителен период от време. Независимо от четиридесетте предходни цикъла, когато е разграден общо 20 g/l фенол, адаптираните имобилизирани клетки на *Rhodococcus wratislawiensis* BN38 демонстрират максимален биодеградационен потенциал при фенолна концентрация 1.2 g/l.

4.12. Биодеградация на фенол от имобилизирани микробни клетки на *Nocardia farcinica* BN26

От представените резултати се вижда, че имобилизираните клетки на *Nocardia farcinica* BN26 имат по-ниска биодеградационна активност в сравнение с тази на свободните клетки. Наблюдават се четири цикъла, всеки от които е с три или четири дневна продължителност. За четиринайсет дни са разградени 2.0 g/l фенол, докато за същия период свободните клетки са разградили 7.0 g/l фенол, т.е.

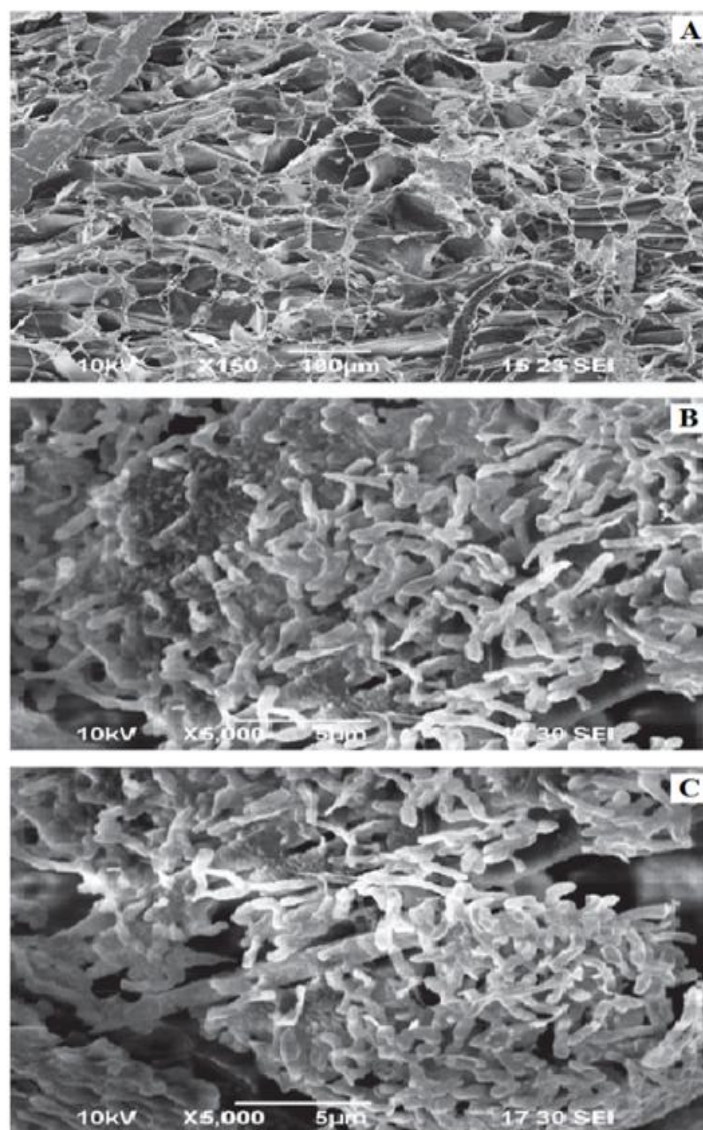
три пъти повече. Имобилизирането на клетки на *Nocardia farcinica* BN26 не довежда до увеличаване на катаболитния им потенциал, което води до извода, че клетките на *Nocardia farcinica* BN26 биха били по-ефективни при използването им в свободна форма.



Фигура 23. Биодegradация на фенол от имобилизирани клетки на щам *Nocardia farcinica* BN26, представена като остатъчен фенол (mg/l) в продължение на четири цикъла, представени като средноаритметични стойности ($\bar{x} \pm \sigma$)

4.13. Изследване на имобилизирания щам *Rhodococcus wratislawiensis* BN38 със сканираща електронна микроскопия (SEM)

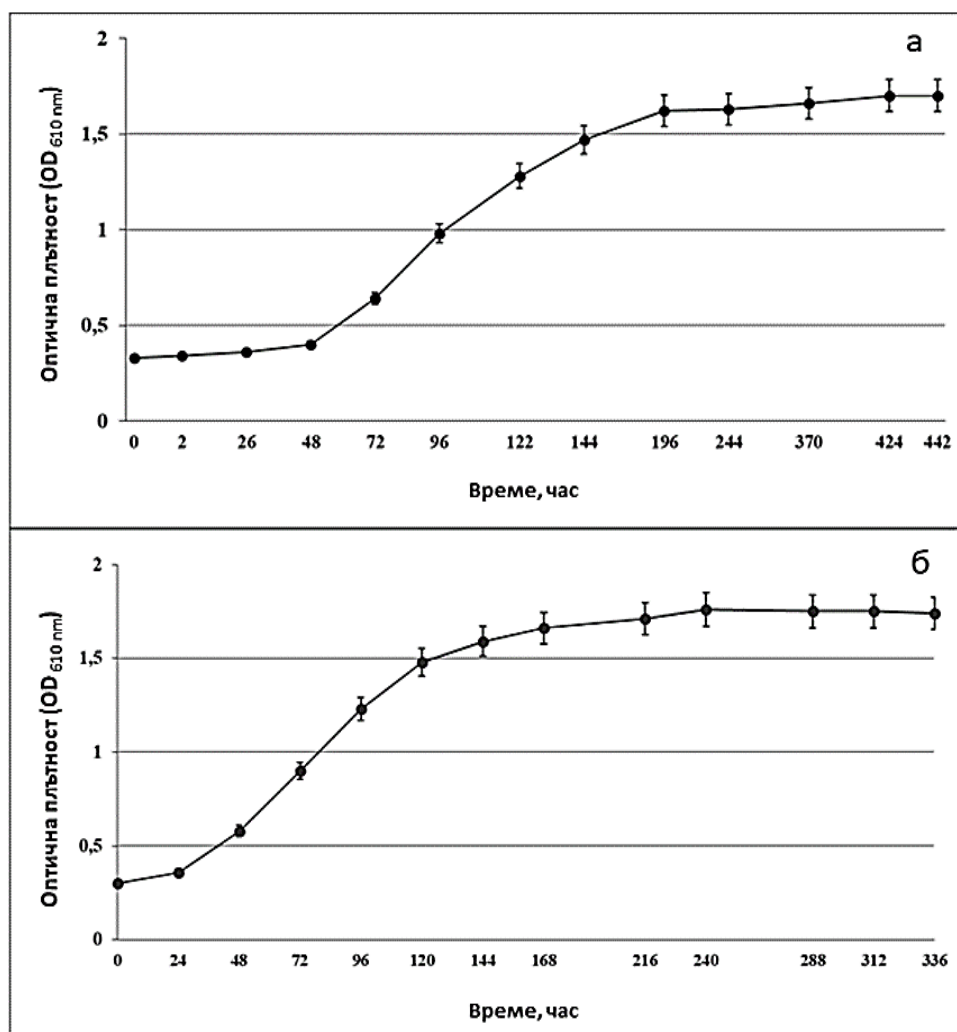
Както се вижда от SEM микрографиите на изследваните проби, полученият криогел има хетерогенна супер-макропореста структура (А). Бактериалните клетки са хомогенно разпределени и прилепнали към всички повърхностни пространства на носителя, образувайки биофилм. Равномерното разпределение е важен критерий за правилната адсорбция и разграждане на фенола и п-хексадекана по цялата повърхност на имобилизираните бактериални колонии. Колониите, образувани от клетките на щама, се визуализират добре от SEM микрографиите (В, С). Освен това проучванията със сканираща електронна микроскопия потвърждават, че клетките запазват формата си и равномерното си разпределение след много цикли на употреба.



Фигура 24. Сканираща електронна микрография (А) криогелна матрица; (В) клетки на *Rhodococcus wratislawiensis* BN38, имобилизирани в криогелната матрица при биоразграждане на фенола, и (С) клетки на *Rhodococcus wratislawiensis* BN38, имобилизирани в матрицата на криогела при биоразграждане на фенол и n-хексадекан.

4.14. Растежни криви на щам *Micrococcus luteus* BN56

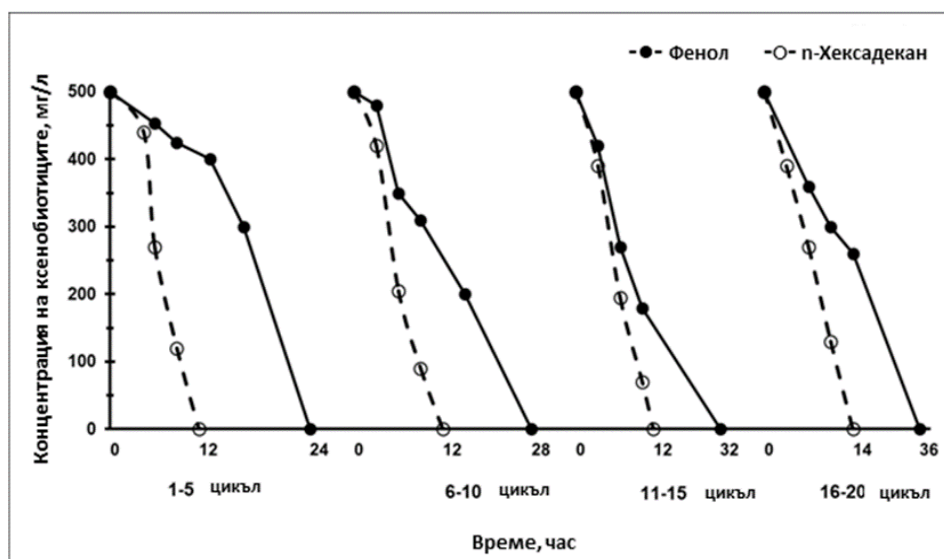
За да бъде по-пълно изследването ни включихме и щам *Micrococcus luteus* BN56.



Фигура 25. Крива на растеж на неадаптирани (а) и адаптирани клетки от щам *Micrococcus luteus* BN56 (б) при условия на полунепрекъснато култивиране, представени като средни аритметични стойности (xav. ± σ).

Проследявайки растежа на културата преди и след адаптация се вижда, че след кратък период на забавяне започва логаритмичната фаза, която продължава около пет дни за адаптираните клетки. При петото подаване на ксенобиотик в концентрация от 500 mg/l, т.е. пети цикъл, се достига стационарна фаза на растеж, продължаваща до леко забавяне на катаболитните процеси. И в двата случая кривите, описващи растежа на клетките на *Micrococcus luteus* BN56, бяха сходни. От съществено значение е циклите на биоразграждане да се осъществяват и по време на стационарната фаза на растеж. Растежът на адаптирани клетки включва по-кратък период на забавяне и логаритмична фаза, продължаваща до петото подаване на двата ксенобиотика.

4.15. Разграждане на ксенобиотици от щам *Micrococcus luteus* BN56



Фигура 26. Едновременно биоразграждане на фенол и n-хексадекан от адаптирания щам на *Micrococcus luteus* BN56 при условия на полунепрекъснато култивиране, представено като средни аритметични стойности (хав. $\pm \sigma$).

Всеки нов цикъл започва след изчерпване на ксенобиотиците и добавяне на нови количества фенол и n-хексадекан (500 mg/l от всяко). Концентрацията на субстрат от 500 mg/l беше напълно разградена и в двата случая, така че беше използвана в последващите изследвания. Кривите, описващи процеса на биоразграждане, последвани от измерване на остатъчната концентрация на фенол и n-хексадекан, показват, че скоростта на процеса е постоянна през първите 10 цикъла. За пълно разграждане на ксенобиотиците беше необходим период от 12-28 часа. Известно увеличение на времето, необходимо през следващите 10 цикъла, се наблюдава, когато биоразграждането на n-хексадекан е напълно завършено за 14 часа, а фенол-за 36 часа. Тези 20 цикъла с общо количество фенол, добавени 10 g/l и n-хексадекан, още 10 g/l, представят не само високата скорост на процесите на разграждане, но и добрата резистентност към ксенобиотиците.

Двадесетте активни цикъла на биоразграждане се провеждат с висока скорост и след 12-36 часа не се откриват остатъчни количества фенол и n-хексадекан. Общото количество разградени фенол и n-хексадекан е 10 g/l за всеки.

Доказано беше, че добавянето на втория ксенобиотик не инхибира едновременното биоразграждане.

4.16. Едновременното биоразграждане на два ксенобиотика и имобилизация

Изследванията на катаболитната активност на някои микробни щамове за едновременното биоразграждане на няколко ксенобиотици, представлява нов подход, тъй като такъв модел е много близо до параметрите, открити в различни отпадни води или почви, където токсичните съединения не се появяват отделно, а в смеси. Постигнахме успешно едновременно биоразграждане на ароматния ксенобиотичен фенол и алифатния такъв - п -хексадекан чрез прилагане на подхода за имобилизация.

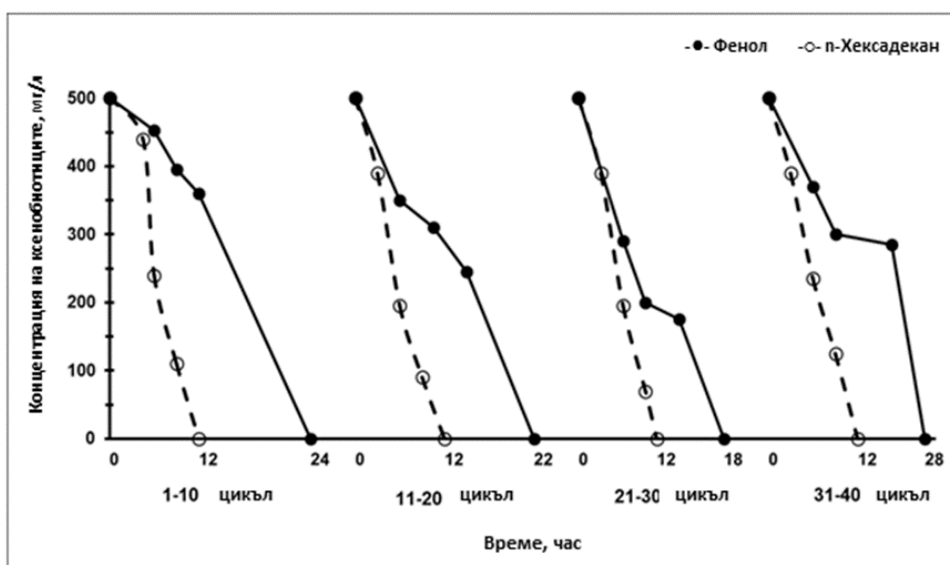
Клетките на изследвания щам се имобилизират *in situ* в биосъвместимите криогели РЕО и РААм. По време на замръзване основната част от водата образува големи поликристали. Клетки, полимер (мономер), фотоинициатор, омрежващ агент и свързана вода (незамразяващ разтворител) се натрупват в незамразена течна микрофаза, където е станало образуването на мрежа. След размразяване, криогелите се състоят от гладки полимерни стени, получени в резултат на микрофазата, които са заобиколени от взаимосвързани пори, пълни главно със свободна вода от разтопените ледени кристали. Вероятно тази вода е една от причините клетките да не губят каталитичната си активност и да оцелеят.

4.17. Сравнение в активностите на свободни и имобилизирани клетки

По време на многократни експерименти със свободни клетки се наблюдава намаляване на способността за биоразграждане след 10 цикъла.

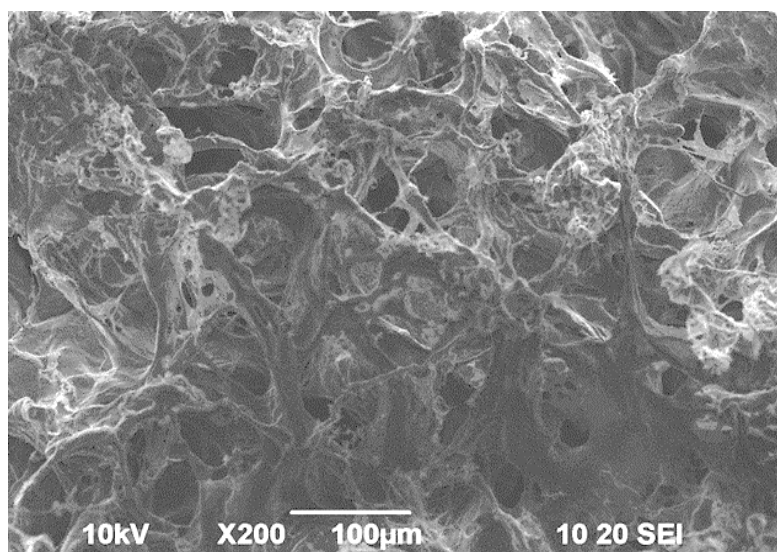
При сравняване на двата типа матрици полиетилен оксид (РЕО) матрицата се оказва по-подходяща по отношение на броя на активните цикли на едновременно биоразграждане на фенол и п-хексадекан. Трябва да се отбележи, че скоростта на биоразграждане на п-хексадекан е по-висока - 12 часа, в сравнение с фенол - 18-28 часа.

Когато се извършва имобилизация с използване на РЕО матрици на криогел, се наблюдава много активно биоразграждане на п-хексадекан и фенол от първото му добавяне (първи цикъл). В продължение на четиридесет цикъла катаболитният потенциал на клетките остава много активен. Получихме доказателство, че избраният метод на имобилизация е успешен и ефективен за дълъг период от време. В края на всеки от първите двадесет цикъла измерената оптична плътност (OD 610 nm) беше 0,1. През следващите двадесет цикъла количеството на десорбираните клетки леко се е увеличило до 0.2 (OD 610 nm) в сравнение с оптичната плътност на свободните клетки 1.6 (OD610 nm). Този факт ясно показва незначително изтичане на клетки и съответно доброто им задържане в обема на гела.

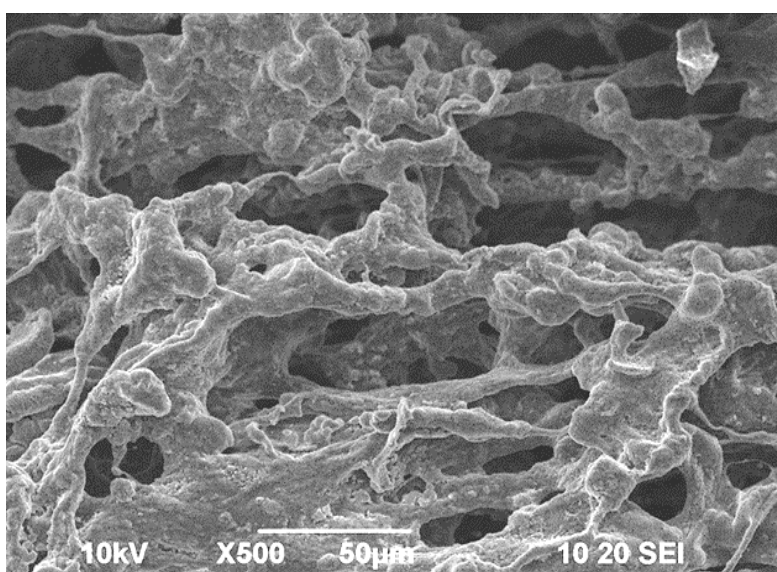


Фигура 27. Процеси на полунепрекъснато биоразграждане на фенол и п-хексадекан от РЕО имобилизирани клетки на *Micrococcus luteus* BN56, представени като средни аритметични стойности (хав. $\pm \sigma$) на остатъчен фенол и п-хексадекан за всеки десет цикъла.

4.18. Изследвания със сканиращ електронен микроскоп (SEM)



Фигура 28. Сканиращи електронни микрофотографии: само PEO матрица

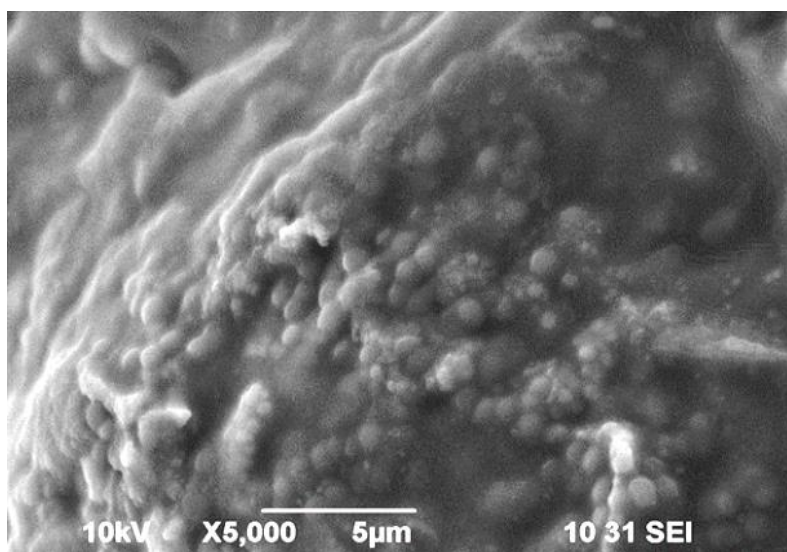


Фигура 29. Сканиращи електронни микрофотографии: само PAAm матрица

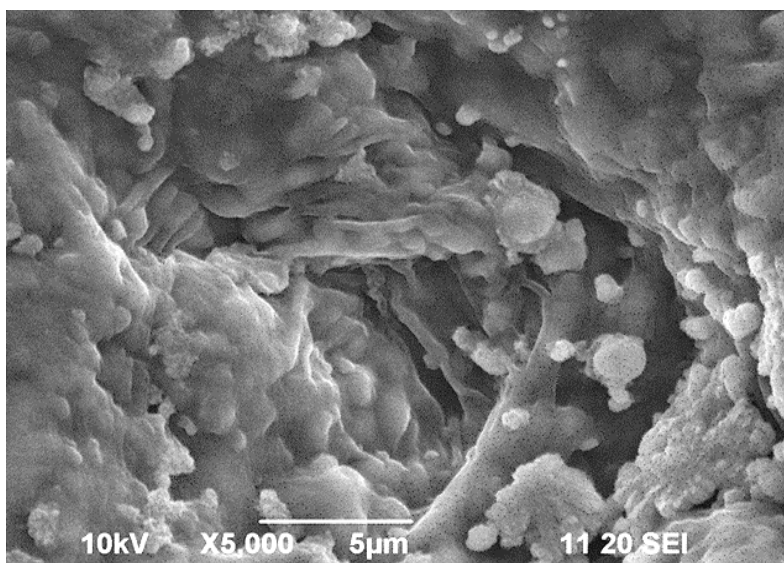
4.19. Сканиращ електронен микроскоп (SEM) на бактериалните клетки в матрицата

Наблюденията със сканираща електронна микроскопия потвърдиха, че клетките запазват формата си и равномерното си разпределение под повърхността на матрицата в образуваните канали и изглеждат частично вградени в порите на матрицата след много цикли на употреба. Иммобилизирането на живи клетки в

супермакропорести матрици предлага огромни предимства за тяхната повторна употреба и стабилност при непрекъсната работа.



Фигура 30. Сканиращи електронни микрофотографии: клетки, уловени в РЕО матрица



Фигура 31. Сканиращи електронни микрофотографии: клетки, уловени в РААm матрица

4.20. Изолитране на нов бактериален щам способен да разгражда ароматни и алифатни ксенобиотици

Новият щам беше изолитран от почви, замърсени с въглеводороди в близост до бензиностанция (София, България). Щамът BN66 е грам-положителен,

клетките са спорообразуващи подвижни и пръчковидни с размери 1–4 μm . Новият бактериален щам BN66 беше изолиран чрез селективно обогатяване и идентифициран като *Bacillus cereus*, който доказва способността си да разгражда алифатни съединения, съставки на суровия нефт, заедно със синтеза на повърхностноактивни вещества. Определянето на 16S рРНК генната последователност беше извършено чрез екстракция на ДНК от чиста култура. Екстрахираната ДНК беше намножена с полимеразна верижна реакция (PCR) с използване на праймери за 16S рРНК на *Bacillus cereus* ATCC 10987 (номер за присъединяване към GenBank NC-003909). Използвани праймери 221 F1 (5' cgc att agc tag ttg gtg a 3') и 537 F2 (5' ccc tgg tag tcc acg ccg ta 3') и обратните 1190 R1 (5' ggc atg atg att tga cgt cat 3') и 1479 R2 (5' ggc atg atg att tga cgt cat 3').

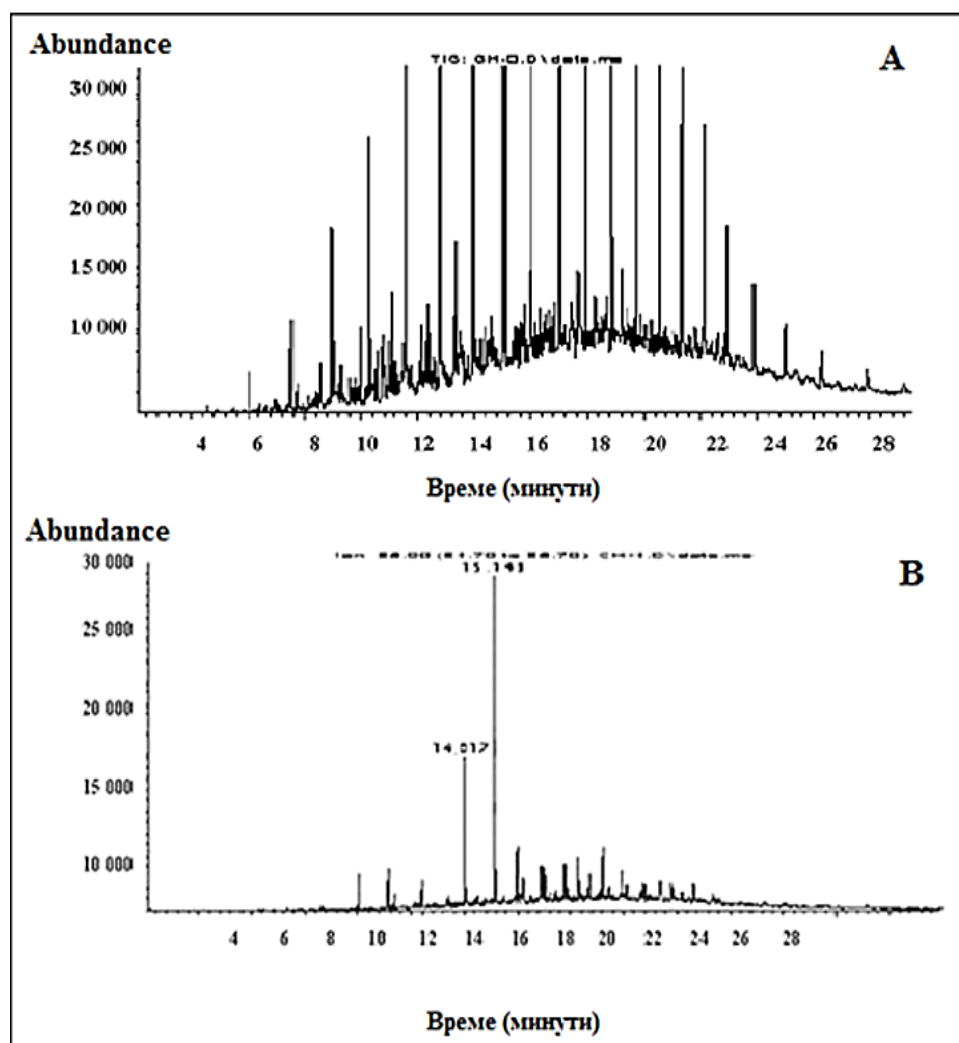
Таблица 1. Усвояване на въглеводороди (начална концентрация 10 g/l) от *Bacillus cereus* BN66, осъществено за 7 дни.

Въглеводороди	Растеж	Биодеградация (%)
C ₅ – C ₉ алкани	+	95
C ₁₀ – C ₁₅ алкани	++	100
C ₁₆ – C ₁₉ алкани	++++	100
Бензен	++	84
Толуен	++	90
Бифенил	++	70
Нафтаден	+++	95
Фенантрен	+	58
Антрацен	+	52

Забележка. + Растеж. Плюс знаците бяха определени въз основа на абсорбцията стойности, измерени при 610 nm (A₆₁₀) и суха биомаса; + (A₆₁₀ > 0,3), ++ (A₆₁₀ > 1,0), +++ (увеличаване на бактериалното сухо тегло под 3,0 g/l), ++++ (увеличаване на бактериалното сухо тегло над 3,0 g/l).

Както се вижда от Таблица 1, BN66 може да усвоява всички тествани n-алкани (C6-C19) за период от 7 дни. Плътният растеж на културата е резултат от използването на C14 – C19. Макар и само незначителен растеж настъпва върху n-алкани с къса верига от хексан към нонан. C5-C9 алканите се разграждат до 95%, докато алканите C10-C15 и C16-C19 са напълно разградени. От тестваните аромани съединения, бензен, толуен и бифенил, се разграждат до 84, 90 и 70%, съответно, като се има предвид, че процентът на деградация на нафтацен, антрацен и фенантрен е 95, 58 и 52%.

4.21. Хроматографски профил при процеса на биодegradация на суров нефт

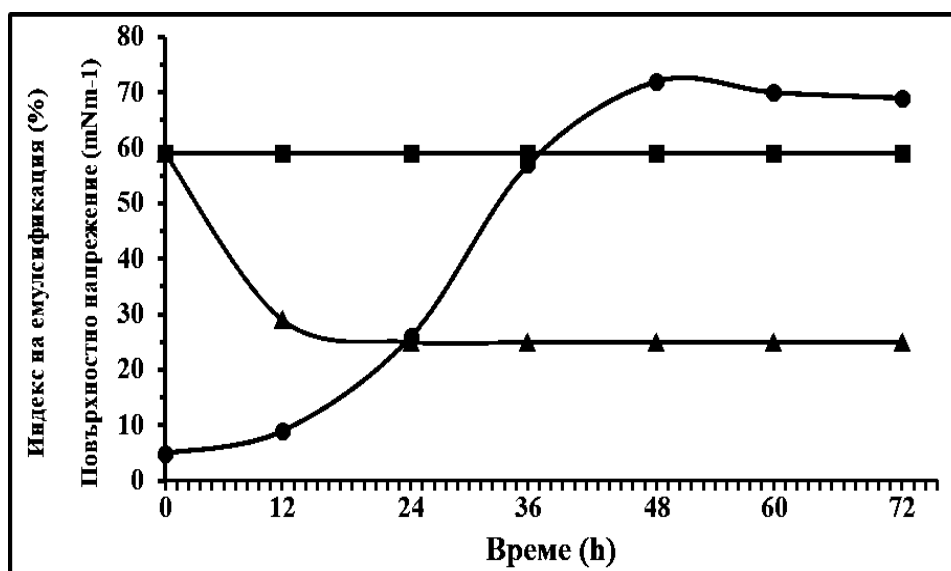


Фигура 32. Хроматографски профил на газовата алифатна фракция преди биоразграждане (A) и след биоразграждане (B).

Способността на щам *Bacillus cereus* BN66 да използва основните класове на въглеводородите беше допълнително потвърдено чрез хроматографски анализи на култури, отглеждани на 1% (v/v) суров нефт. Хроматографският профил на алифатна фракция (В) показва, че n-алканите са почти напълно разградени (93%) от свободните клетки след 2 дни.

4.22. Способност на новоизолирания бактериален щам да продуцира биосърфактант

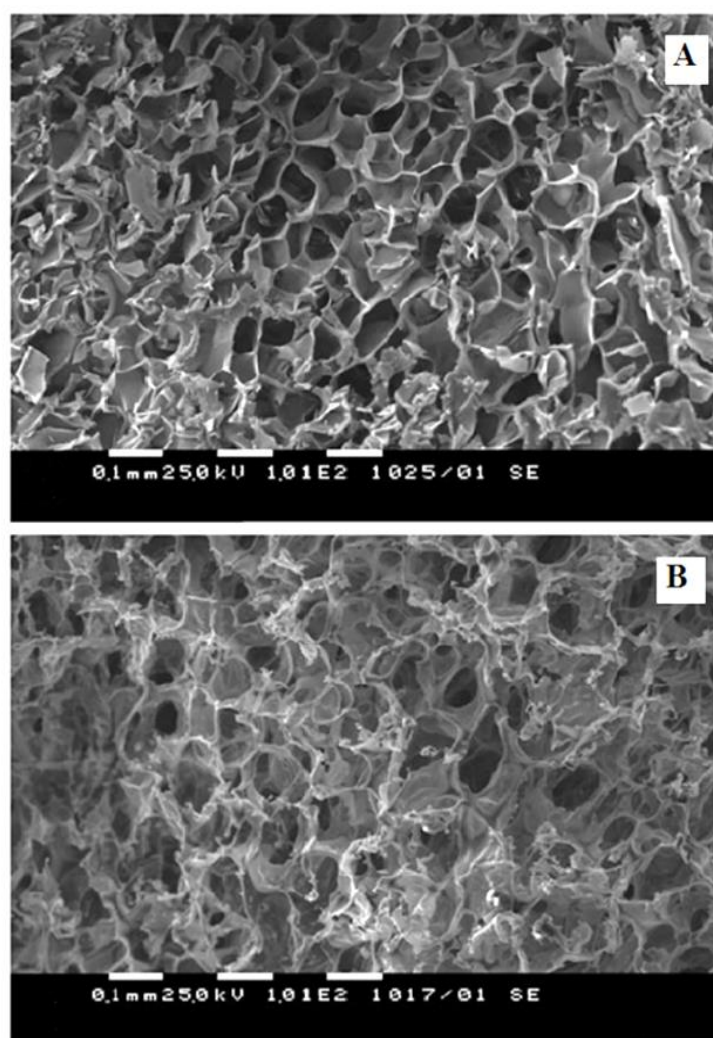
Основна пречка за биоразграждането на въглеводородите е присъщата им хидрофобност, която ограничава бионаличността на замърсителите и следователно намалява степента на биоразграждане. Повърхностноактивните вещества са тези, които могат да подобрят степента на биоразграждане на въглеводородите чрез увеличаване бионаличността или чрез опосредстване на разтварянето или прикрепянето навлизането и преминаването на въглеводорода на границата съединение – вода.



Фигура 33. Индекс на емулсификация (EI24) (●) и повърхностно напрежение (▲), измерени по време на растежа на *Bacillus cereus* BN66 на минерална солева среда с 1% суров нефт като източник на въглерод. Повърхностно напрежение (■) на абиотична контрола.

Пониженото повърхностно напрежение на хранителната среда и определянето на индекса на емулсификация (EI24) свидетелстват за продукция на биосърфактант. Когато щам BN66 се култивира с 1% суров нефт като единствен източник на въглерод за период от 12 часа, повърхностното напрежение на културата спада бързо, за да достигне своята най-ниска точка от 29 mN m^{-1} и не се променя до края на процеса.

4.23. Имобилизирание на *Bacillus cereus* BN66 в полиакриламидни криогелове



Фигура 34. SEM микрографии на полиакриламидни криогелове получени от полимерен предшественик (А) и мономерен (В).

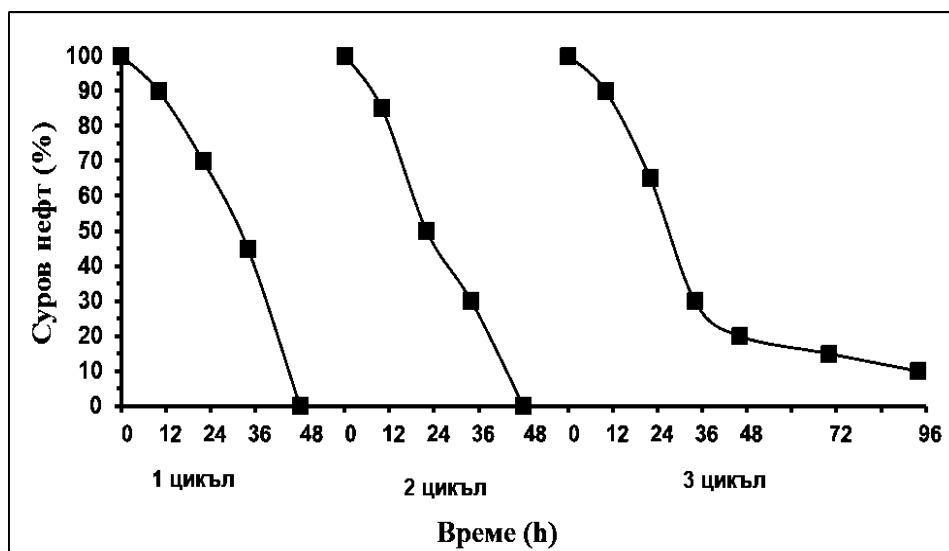
В този случай използвахме полиакриламидни криогелове, синтезирани от два различни предшественика, линеен полимер с висока моларна маса (криогел РААm) и мономер (ААm криогел), които са получени чрез комбинацията на криотропна техника и фото-омрежване. Полученият материал съдържа хетерогенна структура от големи взаимосвързани пори (80 - 100 μm), заобиколени от тънки стени (А).

Въпреки че ААm криогеловите притежаваха идентична макропореста структура с криогеловите РААm, двата материала показаха различни вискоеластични свойства, като криогеловите, базирани на полимери с висока молекулна маса са по-меки от ААm геловите (В).

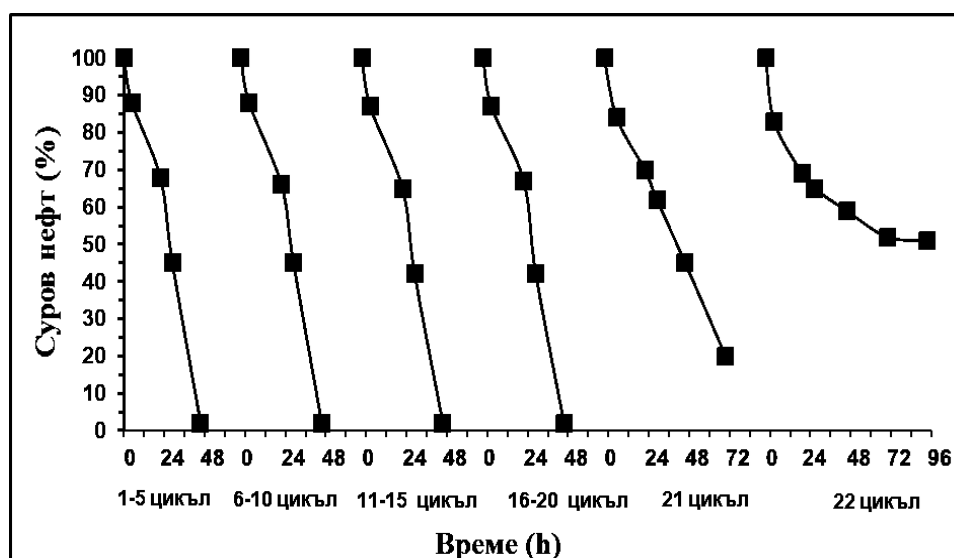
Клетките на *Bacillus cereus* бяха затворени и в двата полиакриламидни гелове чрез нахисване на лиофилизирани дискове в клетъчна суспензия докато 95% от суспензията е навлязла в матрицата. Забележително е, че в случая с криогел, синтезиран от полимер с висока моларна маса (OD610 0,2) изтичането на клетки беше незначително, докато при другата матрица (криогел ААm) беше установено изтичане на клетки - (OD610 1.4). Въз основа на този резултат, предпочитаната матрица се определи тази, получена на основата на полимер с висока молекулна маса, който е включен в нашите по-нататъшни изследвания.

4.24. Разграждане на суров нефт от свободни и имобилизирани клетки на *Bacillus cereus* BN66

За да се минерализира цялото добавено количество суров нефт (3 g/l), процесът отне три цикъла на работа при свободните клетки (Фигура 35). След това експериментите бяха проведени при полунепрекъснат режим на работа в 22 активни цикъла с имобилизираните препарати. Краят на всеки цикъл беше маркиран, когато цялото количество суров нефт беше изчерпано. Получените резултати потвърдиха, че методът на имобилизация се оказва много ефективен при биодеградационните процеси, осъществявани от *Bacillus cereus* BN 66 за дълъг период от време - 47 дни при висока скорост и стабилност (Фигура 36).



Фигура 35. Разграждане на суров нефт от свободни клетки на *Bacillus cereus* BN66, представени като средноаритметични стойности ($\text{хср.} \pm \sigma$)

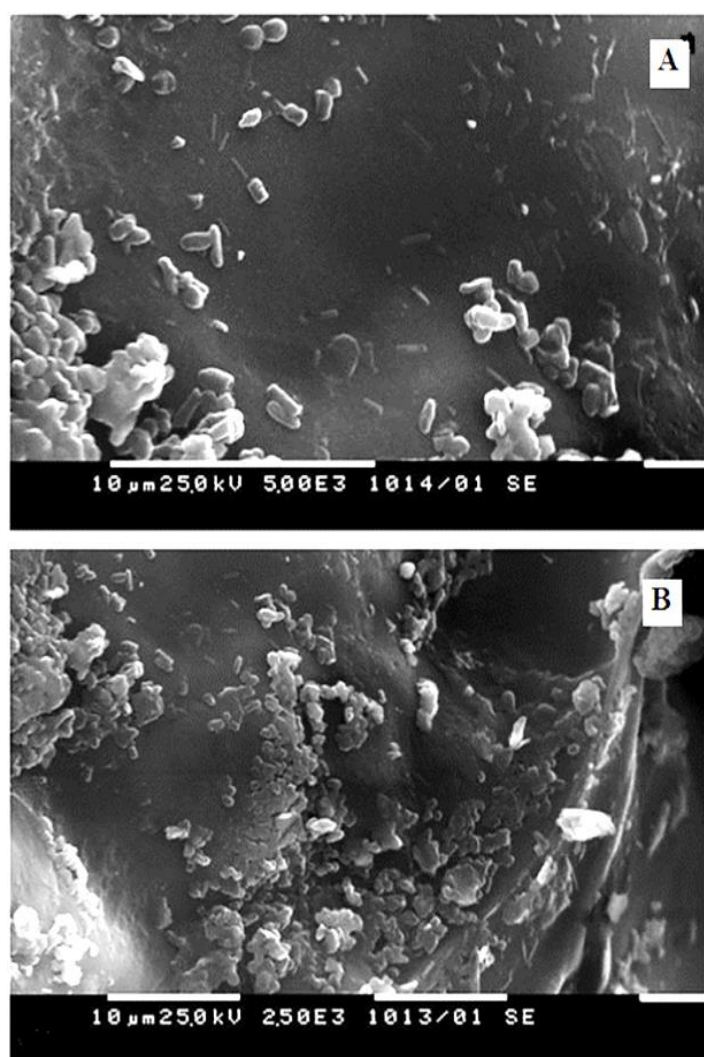


Фигура 36. Разграждане на суровия нефт чрез имобилизирани в криогел клетки на *Bacillus cereus* BN66, представени като средноаритметични стойности ($\text{хср.} \pm \sigma$)

4.25. Визуализация на криогелните матрици и имобилизираните в тях клетки

Имобилизацията на жизнеспособни микробни клетки, което може да бъде постигнато чрез закрепване, вмъкване в обема или захващане, локализира

клетките в определен регион и позволява многократното използване на тяхната каталитична активност. Високата ефективност на имобилизираните клетки и високия афинитет между матрицата и субстратите водят до ефективно разграждане, което беше доказано и в нашите експерименти. Ние постигнахме по-добри показатели с полиакриламидни криогелове, получени от полимерния предшественик. Степента на разграждане се увеличи в резултат на увеличената наличност и достъпност на субстратите за клетките и по-добро взаимодействие между субстратите и имобилизираните клетки.



Фигура 37. SEM микрографии на полиакриламидни криогелове, получени от мономерен предшественик (А) и полимерен (В) с имобилизирани клетки *Bacillus cereus* BN 66.

5. Обсъждане

Устойчивостта на органичните химикали е ключово свойство при тяхната оценка, касаеща риска за околната среда и човешкото здраве. Разграждането им от микробите е един от основните процеси, който е от особена значимост за премахване на ксенобиотици от околната среда [Kolvenbach et al., 2014]. В настоящия дисертационен труд са разгледани приспособителните възможности за осъществяване на биодеградация на ароматни и алифатни ксенобиотици и тези процеси са проследени при свободни и имобилизирани в подходящи носители клетки от подбрани бактериални щамове.

Може да се предположи, че продължителното излагане на ксенобиотик, вероятно е довело до катаболни промени в клетките, водещи до по-добра адаптация и оцеляване [Baptiste et al., 2019]. Добре е описано в литературата, че микробната адаптация стимулира биоразграждането на органични химикали. Така микробните видове могат да издържат на потенциалните токсични ефекти на химикалите или дори да ги разграждат [van der Meer, 2006]. Многократно повишения биодеградационен потенциал на изследваните щамове *Rhodococcus wratislawiensis* BN38 и *Nocardia farcinica* BN26, се изразява преди всичко в много по-големия брой цикли, по време, на които целият внасян ксенобиотик е изцяло разграден. В условията на полунепрекъснат биодеградационен процес, в продължение на 22 цикъла, общото количество разграден фенол от клетки *Rhodococcus wratislawiensis* BN38 е 11 g/l. При същите условия клетките на *Nocardia farcinica* BN26 разграждат 9.5 g/l фенол в продължение на 19 цикъла. Така напр. *Rhodococcus sp.* DG е изолиран от замърсена с дизел почва и е използван за разграждане на фенола в течна минерална среда. Получените от авторите резултати показват, че скоростта на деградация се увеличава с увеличаване на концентрацията на фенол до 750 mg /l и след това намалява поради токсичния му ефект върху бактериалния растеж [Gao et al., 2021]. Същото явление се наблюдава и в нашата експериментална работа. Поради тази причина

сметнахме за удачно да включим технологията на имобилизация на цели клетки като опция за запазване на каталитичната активност на изследваните щамове за по-продължителен период от време, като по този начин клетките биват и защитени спрямо неблагоприятните въздействия на по-високите концентрации от изследваните ксенобиотици. Използването на имобилизирани клетки е описано по повод биодеградация на различни замърсители на околната среда в трудовете на редица учени [Chen et al., 2012; Kiran et al., 2018; Partovinia и Naeimpoor, 2019]. Забелязано е, че скоростта на биоразграждане може да бъде повишена, използвайки техника за имобилизация, особено при екстремни условия на средата [Partovinia и Rasekh, 2018]. Отбелязано е, че имобилизираните клетки в топчета от калциев алгинат разграждат около 70% от 1000 mg/l фенол в сравнение със само 31% от свободните клетки след 72 часа и около 98% разграждане се постига с имобилизирани клетки след 120 часа. Иmobилизирани клетки могат да се използват повторно в продължение на десет цикъла със средна скорост на разграждане от 31,3 mg/l за час [Gouda, 2007]. Иmobилизацията не само опростява отделянето и възстановяването на използваните клетки, но също така прави приложението им многократно, което намалява общите разходи [Cunningham et al., 2004]. Иmobилизираните клетки на *Pseudomonas plecoglossicida* се оказват по-ефективни от свободните клетки, които имат способността да разграждат 100% от карбаматите при 30°C, докато в случай на свободни клетки ефективността за разграждане на карбамати е 80% при 30°C [Fareed et al., 2019]. Wilsey и Bradely (1996) използват свободни и имобилизирани клетки на *Pseudomonas sp.* за разграждане на петрол във водна система. Изследването показва, че имобилизацията води до комбинация от засилен контакт между клетката и въглеводородните капчици и повишено ниво на рамнолипидно производство. Рамнолипидите причиняват по-голяма дисперсия на неразтворими във вода п-алкани във водната фаза поради техните амфифилни свойства, защото молекулите им се състоят от хидрофилни и хидрофобни части и намаляват интерфациалното напрежение на маслено-водните системи. Това довежда до по-добро

взаимодействие на клетките с многото разтворени въглеводородни капчици, които са по-малки от клетките и бързото навлизане на въглеводорода към клетките. Diaz et al. (2002) съобщават, че имобилизацията на бактериалните клетки подобрява скоростта на биоразграждане на суровия нефт в сравнение със свободните живи клетки. Имобилизирани системи на основата на поливинил алкохолен криогел са използвани и е установено, че са най-успешни по отношение на процента отстранен дизел след 32 дни [Rahman et al., 2006].

В проведените експерименти се оказва, че високата начална концентрация на фенола оказва своя инхибиращ ефект и върху растежа, и върху биодеградационната активност на клетки на *Nocardia farcinica* BN26. При тези екстремни условия се наблюдава разлика в катаболитния потенциал на двата изследвани щамове, която е в полза на *Rhodococcus wratislawiensis* BN38.

Сравнително нов подход в изследванията на катаболитната активност на микробни щамове е едновременната биодеградация на няколко ксенобиотици. Такъв модел е много по-близо до реалните параметри на отпадните води, съдържащи различни токсични вещества. Често ароматни съединения и алифатни алкани се срещат заедно в различни отпадъци [Dawson et al., 2007]. Микроорганизми, способни да разграждат ксенобиотични съединения като фенол до безвредни крайни продукти са *Pseudomonas stutzeri* [Tambekar et al., 2012], *Nocardia hydrocarbonoxydans* (NCIM 2386) [Shetty et al., 2008], *Micrococcus varians* EPRIS14, *Bacillus subtilis* EPRS12, *Pseudomonas alcaligenes* EPRIS11, *Bacillus licheniformis* EPRIS21, *Bacillus laterosporus* EPRIS41, *Pseudomonas putida* DAF1, *Bacillus firmus* EPRIS22 и *Acinetobacter* sp. EPRIS32 [Bayoumi и Abul-Hamd, 2010]. N-хексадекан може да се усвоява от *Pseudomonas putida*, *Rhodococcus erythropolis* и *Bacillus thermoleovorans*, изолирани от замърсени почви [Abdel-Megeed et al., 2010]. Много бактериални щамове са изолирани със способността да разграждат n-хексадекан и фенол по отделно, които често се използват за отстраняване на нефт и ароматни замърсители. Съобщава се обаче, за малко щамове с двойни

способности [Sun et al., 2012]. Така например, Hristov et al. (2012) наблюдават едновременно биодеградация на фенол и биосорбция на тежки метали от дрожева асоциация, които са доказали висок катаболитен потенциал. Gallego et al. (2003) са изследвали едновременната биодеградация на 2-хлорфенол, фенол и m-крезол в условия на непрекъснат процес. В настоящите изследвания е направен опит за едновременна биодеградация на алифатни и ароматни ксенобиотици, т.е. хидрофобни и хидрофилни токсични вещества, чието разграждане се извършва по различни катаболитни пътища. Високата биодеградационна активност на свободни клетки на щам *Rhodococcus wratislawiensis* BN38 се изразява преди всичко в големия брой активни цикли, когато многократно подаваният фенол е напълно разграден за двацет и четири часов период. Натрупването на остатъчен п-хексадекан би могло да се обясни с по-ниските скорости на неговата биодеградация. Такъв феномен е наблюдавал и Sun et al. (2012). И в този случай, един от подходящите начини за подобряване на оцеляването и задържането на агентите за биоремедиация в замърсените места е да се използват бактериални клетки в имобилизирана форма [Bayat et al., 2015]. В литературата има редица съобщения за имобилизация на клетки на род *Rhodococcus* върху различни видове матрици. Prieto et al. (2002) имобилизирали клетки на *Rhodococcus erythropolis* на калциев алгинат или гранулиран активен въглен. Други изследователи са наблюдавали десет активни цикъла на фенолна биодеградация от имобилизирани на калциев алгинат клетки на *Rhodococcus sp.* [Hensel и Straube, 1990; Pai et al., 1995].

В настоящия труд са проучени възможностите за интензифициране на процеса на разграждане на фенол и хексадекан чрез имобилизиране на микробните клетки на щам *Rhodococcus wratislawiensis* BN38 върху криогелни носители на основата на метилцелулоза. Получените от нас резултати доказаха четиридесет активни цикъла на фенолна биодеградация, като общото количество прибавен и разграден фенол е 20 g/l. Определен е и максималният

биодеградационен потенциал, който е при стартова концентрация на фенол над 1.2 g/l. В литературата е известна и голямата фенол биодеградационна способност на имобилизиран щам *Trichosporon cutaneum* R57 [Йотова и колектив, 2001; Yotova et al., 2009].

Доказана беше катаболитната способност на имобилизирани клетки на щам *Rhodococcus wratislawiensis* BN38 за едновременна биодеградация на хидрофилен и хидрофобен ксенобиотик в условия на полунепрекъснат процес, която се оказва много по-висока в сравнение със свободните клетки. Тя се изразява в големия брой цикли по време, на които многократно прибавяните фенол и п-хексадекан са напълно разградени и няма никакво инхибиране или забавяне на процесите. В литературата няма много съобщения за едновременно разграждане на алифатни и ароматни съединения. Sun et al. (2012) са изследвали едновременната биодеградация с изолиран от речни води щам, който е разграждал по 400 mg/l фенол и п-хексадекан, но само през един единствен цикъл. Увеличената устойчивост на клетките в случая би могла да се обясни със защитния ефект при имобилизацията, свързан с образуване на колонии под повърхността на носителя. Там се формира дифузионна бариера, която пречи за рязкото навлизане на различни ксенобиотици в клетката [Basha et al., 2010].

Добре известно свойство на Грам (+) бактерии [Martinkova et al., 2009], особено на родококите и близкородствените им родове актинобактерии, е способността им да разграждат алкани [Finnerty, 1992]. Растежът на тези микроорганизми върху алифатни въглеводороди често е съпроводен с продукцията на биосърфактанти. Сърфактантните молекули съдържат силно изразена хидрофобна и хидрофилна част, поради което се разполагат на границата между маслената и водна фази. По този начин те понижават напрежението между фазите и повишават адхезията и достъпа на клетките до субстрата [Fiechter, 1992]. От друга страна, съществуват данни показващи, че микроорганизмите могат да използват своите биосърфактанти за регулиране на повърхностните свойства на клетката в процесите на адхезия към субстрата [Ron и Rosenberg, 2001]. Известна

промяна в клетъчната хидрофобност беше наблюдавана и при двата изследвани щама. Този резултат, както и измерените нива на трехалозолипиди по време на фенолната биодеградация свидетелстват за това, че биосърфактантите изиграват своята роля в процеса на разграждане на ксенобиотика. При хидрофилния ксенобиотик фенол съществуват описани механизми, улесняващи неговата минерализация [Reza Soudi и Kolahchi, 2011]. Най-вероятно последният променя функциите на клетъчната мембрана като променя белтък/липидното съотношение в нея [Sikkema et al., 1995]. Важно е да се отбележи, че едновременното присъствие на двата ксенобиотика не повлиява скоростта на едновременния биодеградиционния процес.

В заключение трябва да се подчертае, че високият катаболитен потенциал на имобилизирани клетки на *Rhodococcus wratislawiensis* BN38 спрямо хидрофилни и хидрофобни ксенобиотици е изключително устойчив във времето. Не за подценяване е изборът на правилен носител, какъвто е използвания в случая криогел, при който каналчетата на порите се изпълват главно със свободна вода. Именно това е причината в тях да се запазва жизнеността на клетките, както и метаболитните им способности. Това би могло да намери приложение в реалните процеси на биодеградация на промишлени отпадни води.

Друг щам, способен на едновременно разграждане на алифатни и ароматни ксенобиотици е *Micrococcus luteus*. И в този случай чрез имобилизация след подбор на подходяща матрица – в случая РЕО и след някои процедури за адаптация и оптимизация беше успешно постигнато цялостно изчерпване както на изпитваните ароматни, така и на алифатните ксенобиотици. В хода на експериментите 10 g/l (100%) фенол и 10 g/l (100%) n -хексадекан се разграждат за 20 активни цикъла на действие (продължителност 12 - 36 h) от свободните клетки на *Micrococcus luteus* BN56, докато чрез прилагане на процедура за имобилизация *in situ*, използвайки РЕО криогелни матрици, тези процеси се интензифицирха, стабилизираха и достигнаха 40 цикъла на действие и успешно едновременно биоразграждане на ароматни и алифатни ксенобиотици (20 g/l + 20

g/l).

Визуализация на имобилизираните клетки от трите щамове в избраните матрици, могат да се разгледат като оценка на осъществяваните биодеградационни процеси.

Наблюденията със сканираща електронна микроскопия и на трите описани щамове потвърдиха, че клетките запазват формата си и равномерното си разпределение под повърхността на матрицата в образуваните канали и изглеждат частично вградени в порите на матрицата. Трябва да се отбележи, че имобилизацията е биотехнологичен инструмент, който значително увеличава потенциала на биоремедиацията [Saha и Bhaskara Rao, 2021].

Важен принос на настоящия дисертационен труд е и изолирането на нов бактериален щам BN66 чрез селективно размножаване, който е идентифициран като *Bacillus cereus* и доказано разгражда суровия нефт, заедно със синтеза на повърхностноактивни вещества. Бактериите, принадлежащи към рода *Bacillus*, са често срещани участници в процеси на биоремедиация и други биотехнологични процеси [Doddamani и Ninnekar, 2000]. Щамове на *Bacillus*, способни да разграждат въглеводороди са изолирани от различни замърсени места. По този начин Zhuang et al. (2002) и Calvo et al. (2004) съобщават за разграждане на нафтаден от *Bacillus naphthovorans* и *Bacillus pumilis*, изолирани съответно от тропически замърсени с петрол морски утайки и петролни отлагания. Щамове на *Bacillus* са способни да разграждат също фенол [Subramanian, 1992], крезол [Duffner et al., 2000], полихлорирани бифенили [Kim et al., 2004] и други. Потенциалът за разграждане на *Bacillus cereus* също е бил изследван за няколко други замърсители, като азо-багрила [Kherha et al., 2005], полициклични ароматни въглеводороди [Karunga et al., 2001], 2,4-дихлорфенол [Matafonova et al., 2006].

В това проучване новоизолираният щам BN66 е идентифициран чрез морфологични, биохимични и 16S rRNA анализи на последователността като член на рода *Bacillus*, като се оказва 100% свързан с *Bacillus cereus*. Щам *Bacillus*

cereus BN66 разгражда ефективно представители на главните класове въглеводороди и сложни въглеводородни смеси като суров нефт. Широко документирано е, че много разграждащи въглеводороди бактерии, за оптимизиране на усвояването на хидрофобни субстрати използват производството на биосърфактанти [Hommel, 1990; Singh и Cameotra, 2004; Nishikiori et al., 1986], което беше определено и в нашите изследвания. Резултатите несъмнено показват, че *Bacillus cereus* BN66 произвежда биосърфактанти, когато се култивира на суров нефт, като по този начин засилва разграждането му. Други изследователи докладват за имобилизирани бактериални спори на *Bacillus subtilis* LAMI008 в 3-милиметрови зърна от хитозан и омрежени с 0.3% глутаралдехид за биоразграждане на n-хексадекан и [Barreto et al., 2010].

Степента на разграждане се увеличи в резултат на увеличената наличност на субстратите за клетките и по-добро взаимодействие между субстратите и имобилизираните клетки, включени в полиакриламидни криогелове, получени от полимерен предшественик спрямо мономерния такъв. Quek et al. (2006) съобщават за имобилизация на *Rhodococcus* sp. F92 върху полиуретанова пяна (PUF) в биоремедиацията на нефтени въглеводороди, като имобилизираните клетки могат да разграждат разнообразие от петролни продукти. Ху и Лу (2010) демонстрират, че отстраняването от почвата на суров нефт е увеличено чрез прилагане на разграждащи въглеводородна бактерии, имобилизиран върху прах от фъстъчени, оризови и кокосови обелки като бионосители [Nunal et al., 2014]. Биоремедиация се осъществява чрез предоставяне на повече налична повърхност за подпомагане както на бактериалния растеж, така и контакт между бактериалните клетки и петролните въглеводороди за по-добро усвояване на суровия нефт.

Отново се доказва способността за повторна и многократна употреба на препаратите в процеси на биодеградация, която остава стабилна и след 47 дни, а скоростта на разграждане от имобилизираните клетки се поддържа на високо

ниво до 20-ия цикъл на работа. Клетките, имобилизирани в криогелове, получени от полиакриламид с висока моларна маса показват по-ефективно разграждане в 22 активни цикъла при полунепрекъснат режим на работа в сравнение със само три цикъла, осъществявани от свободни клетки.

В литературата са описани пет щамове бактерии, а именно, *Exiguobacterium sp.* ASW-1, *Pseudomonas aeruginosa* щам ASW-2, *Alcaligenes sp.* ASW-3, *Alcaligenes sp.* ASS-1 и *Bacillus sp.* ASS-2, изолирани от брега на Zhejiang в Китай и са използвани при усвояване на 75,1% суров нефт (1%, w/v) за 7 дни чрез прилагане на калциев алгинат - активен въглен като носители за включване [Chen et al., 2007]. Ефективността от процедурата по имобилизация се потвърди в случая и от високата степен на разграждане на алифатната фракция (почти 100% след 20 цикъла на работа), като се използват полиакриламидни криогелни матрици.

Изборът на носител е важен въпрос и зависи от целта, за която ще се използва материала. Броят на клетките, прикрепени към носителя зависи от вида му. В нашите експерименти, ключов момент за добър процес на биодеградация от клетките до 22 цикъла беше липсата на изтичане на клетки. Изглежда, че криогелните матрици, получени от прекурсор с висока молекулна маса има вътрешна структура, която държи клетките вътре в носителя. Това е най-вероятно поради по-голямото набъбване и по-хлабавата структура на мрежата PAAm. Стените на криогела са частично затворени и с взаимосвързани пори, съдържащи клетките. Именно по този начин те предотвратяват изтичането на клетки. В случай на криогелове от AAm, включването на омрежващия агент доведе до повишена плътност на омрежване и по-ниска способност за набъбване, което заедно с по-големия размер на порите след набъбване в този материал клетките могат по-лесно да изтекат от носителя във водна среда.

В крайна сметка беше демонстрирано, че имобилизираните клетки могат да бъдат по-ефективни, да действат по-добре и по-бързо и за по-дълъг период от време при процесите на биоремедиация.

Изводи

1. Избраните щамове *Rhodococcus wratislawiensis* BN38, *Nocardia farcinica* BN26 и *Micrococcus luteus* BN56 показаха изразен биодеградационен потенциал към ароматния ксенобиотик фенол.
2. Биодеградационния потенциал на изследваните щамове е многократно повишен чрез адаптация, което се изразява в по-големия брой цикли, по време, на които внесеният ксенобиотик е изцяло разграден.
3. Адаптираните клетки на *Rhodococcus wratislawiensis* BN38 притежават най-добрата способност за разграждане на фенол във всички изследвани концентрации, като катаболитният потенциал не намалява, а се запазва и по време на стационарната фаза на растеж на адаптирания щам.
4. Щам *Rhodococcus wratislawiensis* BN38 притежава висок биодеградационен потенциал спрямо хидрофилни (фенол) и хидрофобни (n-хексадекан) ксенобиотици по отделно и едновременно.
5. При клетъчна имобилизация в криогелове от смес на хидроксипропилцелулоза и N-изопропилакриламид 1:1 се наблюдава ясно изразена устойчивост и дълготрайност на изследваните процеси, като в рамките на четиридесет цикъла се съхранява активното разграждане на фенол (20 g/l) и n-хексадекан (20 g/l) - общо количество 40 g/l.
6. Адаптираните клетки на *Micrococcus luteus* BN56 в свободна форма реализират едновременно разграждане и на двата ксенобиотика- 10 g/l фенол и 10 g/l n-хексадекан в 20 активни цикъла на работа с продължителност 12-36 часа.
7. След *in situ* имобилизация в матрици от полиетилен оксид на клетки на *Micrococcus luteus*, се постигат 40 цикъла на повтарящо се успешно едновременно биоразграждане на алифатния хексадекан и ароматния ксенобиотик фенол (20 g/l + 20 g/l), като биодеградацията не е възпрепятствана от никой от двата ксенобиотика.

8. Изолиран е нов бактериален щам BN66, който е идентифициран като *Bacillus cereus* и е доказана способността му да разгражда съставките на суровия нефт.
9. При щам *Bacillus cereus* BN66 е доказано паралелно понижаване на повърхностното напрежение на хранителната среда, което предполага синтез на повърхностноактивни вещества, потвърдено от стойността на индекса на емулсификация, които опосредстват биодеградиационните процеси.
10. Имобилизирването на щам *Bacillus cereus* BN66 в синтезиран от полимер с висока молекулна маса (РААм криогел) води до стабилност и интензификация на биодеградиационните процеси, след имобилизация, потвърдено от високата степен на разграждане - 100% от алифатната фракция след 20 цикъла на работа без инхибиране.

Приноси

1. Постигнато е стабилно едновременно биоразграждане на въглеродородни ксенобиотици до пълното изчерпване на 20 g/l от ароматния ксенобиотик фенол и 20 g/l от алифатния ксенобиотик n-хексадекан в 40 активни цикъла от имобилизирани в криогел (на основата на хидроксипропилцелулоза и N-изопропилакриламид в съотношение 1:1) клетки на *Rhodococcus wratislawiensis* BN38, а при *Micrococcus luteus* BN56, това е постигнато при използване на полиетилен оксидна криогелна матрица.
2. Оригинален принос е възможността за приложение на адаптираните и имобилизирани клетки на щам *Rhodococcus wratislawiensis* BN38 и *Micrococcus luteus* BN56 в реални процеси на биологичното пречистване на отпадни води или замърсени почви.
3. Изолиран е нов бактериален щам BN66 чрез селективно обогатяване, идентифициран като *Bacillus cereus*, който доказано разгражда суровия нефт, заедно със синтеза на повърхностноактивни вещества.
4. За първи път е осъществена имобилизация на клетки на новоизолирания щам *Bacillus cereus* BN66 в криогелен носител на основата на полиакрил амид, като начин за увеличаване интензивността на процеса, който е приложим в биоремедиацията на замърсени с петрол места.
5. Доказано е, че използването на техниката на имобилизация е сполучлив подход, което се прояви чрез високата ефективност на имобилизираните клетки на *Rhodococcus wratislawiensis* BN38, *Micrococcus luteus* BN56 и *Bacillus cereus* BN66, които проявяват голяма стабилност и устойчивост, заедно с висок афинитет към използваните токсични субстрати, като осъществяват тяхната биодеградация.

Списък с публикации по темата на дисертацията

1. Hristov A., Christova N., **Nacheva L.**, Stoineva I., Kabaivanova L. Biodegradation potential of *Nocardia farcinica* BN26 for xenobiotics mineralization.. Comptes Rendus de L'acad_emie Bulgare des Sciences, 67, 6, 2014, ISSN:ISSN 1310-1331, 821-830. JCR-IF (WEB OF SCIENCE):**0.284 Q 3**
2. Hristov, A., Christova, N. Kabaivanova, L., **Nacheva, L.**, Stoyneva, I., Petrov P. Simultaneous biodegradation of phenol and n-hexadecane by immobilized in cryogel biosurfactant producing strain *Rhodococcus wratislawiensis* BN38. Polish Journal Microbiology, 65, 3, 2016, ISSN:1733-1331, 287-293. JCR-IF (WEB OF SCIENCE):**0.951 Q3**
3. Christova N., Kabaivanova L., **Nacheva L.**, Petrov P., Stoineva I. Biodegradation of crude oil hydrocarbons by a newly isolated biosurfactant producing strain. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 33, 1, Taylor & Francis, 2019, ISSN:1310-2818, 863-872. SJR (SCOPUS):0.394, JCR-IF (WEB OF SCIENCE):**1.186 Q 3**
4. **Nacheva L.**, Christova N., Stoineva I., Petrov P., Kabaivanova L. *Micrococcus luteus* strain in free and immobilized form is capable of simultaneous utilization of aromatic and aliphatic xenobiotics. Acta Microbiologica Bulgarica, 37, 2, 2021, ISSN:0204-8809, 81-87. (SCOPUS)

Общ импакт фактор на публикациите по дисертацията- 2.421

Изнесен доклад пред международно научно мероприятие по темата на дисертацията

Начева Л., Кабаиванова Л. Биоремедиация на алифатни и ароматни ксенобиотици от бактериален щам *Micrococcus luteus* в свободна и имобилизирана форма. Seventeenth International Scientific Conference “Space, Ecology, Safety”, 20-22 October 2021, Sofia, Bulgaria.

Забелязани цитати на публикациите по темата на дисертацията

1. Hristov A., Christova N., **Nacheva L.**, Stoineva I., Kabaivanova L. Biodegradation potential of *Nocardia farcinica* BN26 for xenobiotics mineralization.. Comptes Rendus de L'academie Bulgare des Sciences, 67, 6, 2014, ISSN:ISSN 1310-1331, 821-830. JCR-IF (WEB OF SCIENCE):**0.284 Q3**

цитира се в:

1. de Araujo, J.E. Genomic and metabolic characterization of *Planctomycetes* isolates from Brazilian mangrove soils. J College of Agriculture Luiz de Queiroz, University of Sao Paulo, Doctoral Thesis, Piracicaba, **@2018**
2. Sánchez-González, M., Álvarez-Urbe, H., Rivera-Solís, R., González-Burgos, A., Escalante-Réndiz, D., Rojas-Herrera, R. Analysis of a phenol adapted microbial community: degradation capacity, taxonomy, and metabolic description. J. Appl. Microbiol. Volume126, Issue3, March 2019, Pages 771-779, **@2019**
3. Azadi, D., Shojaei, H. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons, phenol and sodium sulfate by *Nocardia species* Isolated and characterized from Iranian ecosystem. Scientific Reports 10(1), DOI: 10.21203/rs.3.rs-15980/v1 PPR: PPR123222, **@2020**
2. Hristov, A., Christova, N. Kabaivanova, L., **Nacheva, L.**, Stoyneva, I., Petrov P. Simultaneous biodegradation of phenol and n-hexadecane by immobilized in cryogel biosurfactant producing strain *Rhodococcus wratislawiensis* BN38. Polish Journal Microbiology, 65, 3, 2016, ISSN:1733-1331, 287-293. JCR-IF (WEB OF SCIENCE):**0.951 Q3**

цитира се в:

1. de Araujo, J.E. Genomic and metabolic characterization of *Planctomycetes* isolates from Brazilian mangrove soils. College of Agriculture Luiz de Queiroz, Doctoral Thesis, Piracicaba, **@2018**
2. Memic, A., Colombani, T., Eggermont, L.J., Rezaeeyazdi, M., Steingold, J., Rogers, Z.J., Navare, K.J., Mohammed, H.S., Bencheri, S.A. Latest Advances in Cryogel Technology for Biomedical Applications. Advanced Therapeutics, 201800114 (45), **@2019**
3. Krivoruchko, A., Kuyukina, M., Ivshina, I. Advanced *Rhodococcus* Biocatalysts for Environmental Biotechnologies, Catalysts 2019, 9, 236; doi:10.3390/catal9030236, **@2019**

4. Josan, V. Selection of Suitable Support Materials for Adsorptive Immobilization of *Rhodococci* Cells. Filodiritto international proceedings “Life sciences, a challenge for the future” ISBN: 978-88-85813-63-2, @2019
5. Pirog, T.P., Heichenko, B.S., Shevchuk, T.A., Muchnyk, F.V. Biosynthesis of Surfactants by Actinobacteria of *Rhodococcus* Genus. Mikrobiol. Z. 2020; 82(2):67-81, @2020
6. Pirog, T.P., Petrenko, N.M., Skrotska, O.I., Paliichuk, O.I., Shevchuk, T.A., Iutynska, G.O. Practically Valuable Properties of the Surfactant Synthesized by *Rhodococcus* Genus Actinobacteria. Mikrobiol. Z. 82(4):94-109., @2020
3. Christova N., Kabaivanova L., **Nacheva L.**, Petrov P., Stoineva I. Biodegradation of crude oil hydrocarbons by a newly isolated biosurfactant producing strain. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 33, 1, Taylor & Francis, 2019, ISSN:1310-2818, 863-872. SJR (SCOPUS):0.394, JCR-IF (WEB OF SCIENCE):1.186 Q3

цитура се в:

1. Ghavipanjeha, F., Moradi, G. Isolation and identification of the same type LMG1242 of biosurfactant-producing strain of *Pseudomonas aeruginosa* from different oil contaminated soils. AsPac J. Mol. Biol. Biotechnol. 2019 Vol. 27 (4) : 115-122, @2019
2. Stefanov, Y., Iliev, I., Marhova, M., Kostadinova, S. Production of Extracellular Phospholipase C by Species of Genus *Bacillus* with Potential for Bioremediation. Ecologia Balkanica, Dec2019, Vol. 11 Issue 2, p279-290. @2019
3. Kumar, A., Hussain, T., Kumar, D., Danish, M., Farooqui, S.A. Microbial remediation and Detoxification of Heavy Metals by Plants and Microbes. In book: The Future of Effluent Treatment Plants: Biological Treatment Systems, Publisher: Elsevier, @2020
4. Olajuyigbe, F.M., Fatokun, C.O., Ehiosu, K.I. Efficiency of crude oil degradation and peroxidase production by indigenous bacteria isolated from Ogoni land, River State, Nigeria. Themed Edition on Sustainable development Goal 14 Volume 13, No 2s, @2020
5. Rawat, G., Dhasmana, A., Kumar, V. Biosurfactants: the next generation biomolecules for diverse applications. Environmental Sustainability 2020 <https://doi.org/10.1007/s42398-020-00128-8>, @2020
6. Tanzadeh, J., Ghasemi, M.F., Anvari, M., Issazadeh, K. Biological removal of crude oil with the use of native bacterial consortia isolated from the shorelines of the Caspian Sea, 2020, Biotechnology & Biotechnological Equipment 34(1):361-374 DOI: 10.1080/13102818.2020.1756408, @2020

7. AhmedIbrahim, A.M., Omar SaeedIbrahim Omar Saeed. Bioremediation of polluted soil with hydrocarbons and heavy metals in some areas of Salah -Din and Nineveh Governorates. Republic of Iraq Ministry of Higher Education and Scientific Research University of Tikrit College of Science Department of Biology, Thesis, @2021
8. Kashtiaray, A., Khadir, A., Ardestani, A.N., Salehpour, N. Biosurfactants and sustainable multifunctional biocompounds for wastewater remediation. In: Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science, Elsevier, Pages 395-417, ISBN 9780128226964, @2021
9. Kumar, A., Hussain, T., Cherukuri, S., Kumar, D., Danish, M., Farooqui, S.A. The Future of Effluent Treatment Plants: Biological Treatment Systems. Microbial remediation and detoxification of heavy metals by plants and microbes. September 2021 In book: The Future of Effluent Treatment Plants, Publisher: Elseiver, @2021
10. Anaukwu, C.G., Ogbukagu, C.M., Ekwealor, I.A. Preliminary Study of Crude Oil Degradation by Microorganisms Isolated from Polluted Soil in Okarki, River State, Nigeria. Applied Ecology and Environmental Sciences 9(4):470-476 DOI: 10.12691/aees-9-4-7, @2021
11. Berillo, D., Aljwaid, A., Caplin, J. Polymeric Materials Used for Immobilisation of Bacteria for the Bioremediation of Contaminants in Water. Polymers 13(7):1073, @2021
12. Sanjivkumar, M., Nagajothi K., Parameswar, A. Biodegradation and bioremediation process. In book: Ecology Research (Volume – III), Editors S. Gupta, S. Mishra, S. Juare, S. Kamble, S. Vhanalakar, pp. 49-59, Bhumi Publishing, ISBN: 978-93-88901-21-5, @2021
13. Anani, O.A., Jeevanandam, J., Adetunji, C.O., Inobeme, A., Oloke, J.K., Yerima, M.B., Thangadurai, D., Islam, S., Oyawoye, O.M., Olaniyan, O.T. Application of biosurfactant as a noninvasive stimulant to enhance the degradation activities of indigenous hydrocarbon degraders in the soil. In book: Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science; Editor(s): Inamuddin, Charles, Oluwaseun Adetunji, Elsevier, Chapter 5 - Pages 69-87, ISBN 9780128226964, @2021
14. Sadighbayan, K., Farazmand, A., Mazaheri-Asadi, M., Sefidan, A.M. A comparative study on four strains of petroleum hydrocarbon degrading bacteria for the bioremediation of petroleum-contaminated soils. Biol. J. Microorg., vol. 10, No. 37, 51-65, @2021
15. Salam, L.B., Obayori, O.S., Ilori, M.O., Amund, O.O. Acenaphthene biodegradation and structural and functional metagenomics of the microbial community of an acenaphthene-enriched animal charcoal polluted soil. 2021 Biocatalysis and Agricultural Biotechnology Volume 32, March 2021, Article number 101951, @2021

16. Saeed, M., Ilyas, N., Bibi, F., Jayachandran, K., Dattamudi, S., Govarthanan, M. Biodegradation of PAHs by *Bacillus marsiflavi*, genome analysis and its plant growth promoting potential. Environmental Pollution Volume 292, Part B, 118343, @2022
17. Das, S., Behera, B.C., Sudarshan, M., Chakraborty, A., Thatoi, H. Bioreduction potential of chromate resistant bacteria isolated from chromite mine water of Sukinda, Odisha. Bioremediation Journal. @2022
18. Baburam C., Mitema A., Tsekoa T., Feto N.A. Bacillus species and their invaluable roles in petroleum hydrocarbon bioremediation. In: Islam M.T., Rahman M., Pandey P. (eds) Bacilli in Agrobiotechnology. Bacilli in Climate Resilient Agriculture and Bioprospecting. Springer, Cham. Online ISBN 978-3-030-85465-2, @2022
19. Nassar H.N., Rabie A.M., Abu Amr S.S., El-Gendy N.Sh. Kinetic and statistical perspectives on the interactive effects of recalcitrant polyaromatic and sulfur heterocyclic compounds and in-vitro nanobioremediation of oily marine sediment at microcosm level. Environ. Res., 209, 112768 @2022

Общ брой цитати на публикациите по дисертацията – 28

Благодарности

На първо място бих искала да благодаря на своя научен ръководител доц. д-р Людмила Кабаиванова, за всеотдайното съдействие и отделено време при експерименталната работа, анализа и интерпретацията на резултатите и ползотворните съвети.

Специално благодаря на гл. ас. Нели Христова, за указанияте насоки, съвети и безрезервната подкрепа и на проф. Петър Петров за реализиране на цялостната експериментална дейност.

Благодаря от цялото си сърце на съпругът си Светлозар, за това, че винаги е до мен и ме подкрепя безрезервно.

