

Biogas Production Potential of Thermophilic Anaerobic Biodegradation of Organic Waste by a Microbial Consortium Identified with Metagenomics

Lyudmila Kabaivanova*, Penka Petrova, Venelin Hubenov and Ivan Simeonov

Life 2022, 12, 702. <https://doi.org/10.3390/life12050702>

Abstract: Anaerobic digestion (AD) is a widespread biological process treating organic waste for green energy production. In this study, wheat straw and corn stalks without any harsh preliminary treatment were collected as a renewable source to be employed in a laboratory-scale digester to produce biogas/biomethane. Processes parameters of temperature, pH, total solids, volatile solid, concentration of volatile fatty acids (VFA), and cellulose concentration, were followed. The volume of biogas produced was measured. The impact of organic loading was stated, showing that the process at 55 °C tolerated a higher substrate load, up to 45 g/L. Further substrate increase did not lead to biogas accumulation increase, probably due to inhibition or mass transfer limitations. After a 12-day anaerobic digestion process, cumulative volumes of biogas yields were 4.78 L for 1 L of the bioreactor working volume with substrate loading 30 g/L of wheat straw, 7.39 L for 40 g/L and 8.22 L for 45 g/L. The degree of biodegradation was calculated to be 68.9%, 74% and 72%, respectively. A fast, effective process for biogas production was developed from native wheat straw, with the highest quantity of daily biogas production occurring between day 2 and day 5. Biomethane concentration in the biogas was 60%. An analysis of bacterial diversity by metagenomics revealed that more than one third of bacteria belonged to class *Clostridia* (32.9%), followed by *Bacteroidia* (21.5%), *Betaproteobacteria* (11.2%), *Gammaproteobacteria* (6.1%), and *Alphaproteobacteria* (5%). The most prominent genera among them were *Proteiniphilum*, *Proteiniborus*, and *Pseudomonas*. Archaeal share was 1.37% of the microflora in the thermophilic bioreactor, as the genera *Methanocorpusculum*, *Methanobacterium*, *Methanomassiliicoccus*, *Methanoculleus*, and *Methanosarcina* were the most abundant. A knowledge of the microbiome residing in the anaerobic digester can be further used for the development of more effective processes in conjunction with the identified consortium.

Резюме: Анаеробното разграждане (AD) е широко разпространен биологичен процес за третиране на органични отпадъци за производство на зелена енергия. В това проучване пшенична слама и царевични стъбла без груба предварителна обработка бяха събрани като възобновяем източник, който да се използва в лабораторен биореактор за производство на биогаз/биометан. Проследени са параметрите на процеса като температура, рН, общо количество твърди вещества, летливи твърди вещества, концентрация на летливи мастни киселини (VFA) и концентрация на целулоза. Измерен е обемът на произведения биогаз. Посочено е въздействието на органичното натоварване, което показва, че процесът при 55 °C толерира по-високо натоварване на субстрата, до 45 g/L. По-нататъшното увеличаване на субстрата не доведе до увеличаване на натрупването на биогаз, вероятно поради инхибиране или ограничения на масовия трансфер. След 12-дневен процес на анаеробно разграждане, кумулативните обеми на добивите на биогаз бяха 4,78 L за 1 L от работния обем на биореактора при натоварване на субстрата 30 g/L пшенична слама, 7,39 L за 40 g/L и 8,22 L за 45 g/L.

Степента на биоразграждане е изчислена съответно на 68,9%, 74% и 72%. Бърз, ефективен процес за производство на биогаз беше разработен от нативна пшенична слама, като най-голямото количество дневно производство на биогаз се получава между ден 2 и ден 5. Концентрацията на биометан в биогаза беше 60%. Анализ на бактериалното разнообразие чрез метагеномика разкрива, че повече от една трета от бактериите принадлежат към клас *Clostridia* (32,9%), следвани от *Bacteroidia* (21,5%), *Betaproteobacteria* (11,2%), *Gammaproteobacteria* (6,1%) и *Alphaproteobacteria* (5%). Най-видните родове сред тях са *Proteiniphilum*, *Proteiniborus* и *Pseudomonas*. Делът на археите е 1,37% от микрофлората в термофилния биореактор, като родовете *Methanocorpusculum*, *Methanobacterium*, *Methanomassiliicoccus*, *Methanoculleus* и *Methanosarcina* са най-разпространени. Познаването на микробиома, намиращ се в анаеробния биореактор, може да се използва допълнително за разработването на по-ефективни процеси във връзка с идентифицирания консорциум.

Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa* BN10 Cells Entrapped in Cryogels

Nelly Christova^a, Petar Petrov^b, and Lyudmila Kabaivanova^{a,*}

Z. Naturforsch. 2013, 68 c, 47 – 52

Abstract: Production of a rhamnolipid biosurfactant by cells of *Pseudomonas aeruginosa* strain BN10 immobilized into poly(ethylene oxide) (PEO) and polyacrylamide (PAAm) cryogels was investigated under semicontinuous shake flask conditions and compared to biosurfactant secretion by free cells. The biosurfactant synthesis was followed over 9 cycles of operation of the immobilized system, each cycle comprising 7 days at ambient temperature and neutral pH. Type and quantity of the carrier were optimized for the rhamnolipid production. The highest rhamnolipid yield of 4.6 g l⁻¹ was obtained in the 6th cycle for the immobilized system with 3 g PEO compared to 4.2 g l⁻¹ obtained for the free cells, thus immobilization provided physiological stability of the cells. Scanning electron microscopy revealed preservation of the cell shape and regular distribution of the cells under the matrix surface. The polymer matrices possessed chemical and biological stability and very good physico-mechanical characteristics which are a prerequisite for a high life span of these materials for the production of rhamnolipids.

Резюме: Производството на рамнолипиден биосърфактант от клетки на *Pseudomonas aeruginosa* щам BN10, имобилизирани в криогелове от поли(етилен оксид) (PEO) и полиакриламид (PAAm), беше изследвано при условия на полунепрекъснато култивиране в колби и сравнено със секрецията на биосърфактант от свободни клетки. Синтезът на биосърфактанта беше проследен в продължение на 9 цикъла на работа на имобилизираната система, като всеки цикъл включваше 7 дни при стайна температура и неутрално рН. Типът и количеството на носителя са оптимизирани за производството на рамнолипид. Най-високият добив на рамнолипид от 4, 6 g l⁻¹ беше получен в 6-ия цикъл за имобилизираната система с 3 g PEO в сравнение с 4, 2 g l⁻¹, получени за свободните клетки, като по този начин имобилизацията осигури физиологична стабилност на клетките. Сканиращата електронна микроскопия разкрива запазване на клетъчната форма и равномерно разпределение на клетките под повърхността на матрицата. Полимерните матрици притежават химическа и биологична стабилност и много добри

физико-механични характеристики, които са предпоставка за високата продължителност на експлоатация на тези материали за производството на рамнолипиди.

Enhanced phenol biodegradation by fungal cells immobilized in hybrid sol-gel matrices

Kolishka Tsekova, Lyudmila Kabaivanova, Alexander Hristov, Georgi Chernev

Comptes rendus de l'Acad'emie bulgare des Sciences 2012, 65(7), 939-946

Abstract: Cells of the strain *Aspergillus awamori* were entrapped in hybrid materials synthesized by the sol-gel method and their capability to degrade phenol was tested. Phenol was used as a sole carbon and energy source and its biodegradation was investigated in repeated batch experiments by free and immobilized cells. Ten cycles of phenol biodegradation were performed using the immobilized cells system and 2000 mg.l⁻¹ phenol was completely degraded. The hybrid sol-gel matrix containing tetraethylortosilicate (TEOS) as an inorganic precursor and chitosan as an organic constituent appeared to be a suitable carrier for this purpose. The performance of the immobilized system reveals the possibility for the development of an efficient technique for phenol degradation with a cost-effective process, involving fungal cells entrapped in sol-gel hybrid matrices.

Резюме: Клетки от щама *Aspergillus awamori* бяха имобилизирани в хибридни материали, синтезирани по зол-гелен метод и беше изпитана тяхната способност да разграждат фенол. Фенолът е използван като единствен източник на въглерод и енергия и неговото биоразграждане е изследвано в многократни периодични експерименти от свободни и имобилизирани клетки. Бяха осъществени десет цикъла на биоразграждане на фенол, като се използва системата с имобилизирани клетки и 2000 mg.l⁻¹ фенол беше напълно разграден. Хибридната зол-гел матрица, съдържаща тетраетилортосиликат (TEOS) като неорганичен прекурсор и хитозан като органична съставка, се оказва подходящ носител за тази цел. Ефективността на имобилизираната система разкрива възможността за разработване на ефективна техника за разграждане на фенол в рентабилен процес, включващ гъбни клетки, имобилизирани в зол-гел хибридни матрици.

Characterization and potential antitumor effect of a heteropolysaccharide produced by the red alga *Porphyridium sordidum*

Biliana Nikolova¹ Severina Semkova¹ Iana Tsoneva¹ Georgi Antov¹ Juliana Ivanova²

Ivanina Vasileva² Proletina Kardaleva³ Ivanka Stoineva³ Nelly Christova⁴ Lilyana

Nacheva⁴ Lyudmila Kabaivanova^{4*}

Eng Life Sci. 2019, 19, 978–985, doi: 10.1002/elsc.201900019

Abstract: Taking into account the rising trend of the incidence of cancers of various organs, effective therapies are urgently needed to control human malignancies. However, almost all chemotherapy drugs currently on the market cause serious side effects. Fortunately, several studies have shown that some non-toxic biological macromolecules, including algal

polysaccharides, possess anti-cancer activities or can increase the efficacy of conventional chemotherapy drugs. Polysaccharides are characteristic secondary metabolites of many algae. The efficacy of polysaccharides on the normal and cancer cells is not well investigated, but our investigations proved a cell specific effect of a newly isolated extracellular polysaccharide from the red microalga *Porphyridium sordidum*. The investigated substance was composed of xylose:glucose and galactose:mannose:rhamnose in a molar ratio of 1:0.52:0.44:0.31. Reversible electroporation has been exploited to increase the transport through the plasma membrane into the tested breast cancer tumor cells MCF-7 and MDA-MB231. Application of 75 µg/mL polysaccharide in combination with 200 V/cm electroporation induced 40% decrease in viability of MDA-MB231 cells and changes in cell morphology while control cells (MCF10A) remained with normal morphology and kept vitality.

Резюме: Като се има предвид нарастващата тенденция на заболяемостта от рак на различни органи, спешно са необходими ефективни терапии за контролиране на човешките злокачествени заболявания. Въпреки това, почти всички лекарства за химиотерапия в момента на пазара причиняват сериозни странични ефекти. За щастие, проучванията показват, че някои нетоксични биологични макромолекули, включително полизахариди от водорасли, притежават противоракови действия или могат да увеличат ефикасността на конвенционалните лекарства за химиотерапия. Полизахаридите са характерни вторични метаболити на много водорасли. Ефикасността на полизахаридите върху нормалните и раковите клетки не е добре проучена, но нашите изследвания доказват клетъчно специфичен ефект на новоизолиран извънклетъчен полизахарид от червеното микроводорасло *Porphyridium sordidum*. Изследваното вещество е съставено от ксилоза:глюкоза и галактоза:маноза:рамноза в моларно съотношение 1:0.52:0.44:0.31. Обратима електропорация е използвана за увеличаване на транспорта през плазмената мембрана в проучваните туморни клетки на рак на гърдата MCF-7 и MDA-MB 231. Прилагането на 75 µg/mL полизахарид в комбинация с 200 V/cm електропорация индуцира 40% намаляване на жизнеспособността на MDA-MB231 клетки и промени в клетъчната морфология, докато контролните клетки (MCF10A) остават с нормална морфология и запазват жизнеността си.

Specific Antitumor Effect of the Combined Action of Algal Heteropolysaccharide and Electroporation

Lyudmila Kabaivanova^{1*}, Juliana Ivanova², Viktoria Pehlivanova³, Biliana Nikolova³

Int. J. Bioautomation 2016, 20(3), 407-416

Abstract: Marine organisms are potentially prolific sources of highly bioactive secondary metabolites that might represent useful leads in the development of new pharmaceutical agents. In this study the biological effect of the freeze-dried heteropolysaccharide, isolated and purified from the red microalga *Rhodella reticulata* strain using electroporation was evaluated. Two different types of cells - tumor and non-tumor were treated with the heteropolysaccharide alone or together with the application of electroporation. The effect of the treatment was evaluated in parallel: with proliferation test for estimating cell viability and with immunofluorescent cytoskeleton staining to establish changes in morphology. Evidence for cell line specific viability reduction (70% from the control in case of cancer cell line treatment and only 30% in

non-tumor cells) in a dose dependent manner was presented. These findings will arouse further interest in heteropolysaccharide as a new anticancer drug suitable for clinical trials.

Резюме: Морските организми са потенциално плодотворни източници на силно биоактивни вторични метаболити, които могат да представляват полезна насока в разработването на нови фармацевтични продукти. В това изследване е оценен биологичният ефект на изолиран, пречистен и лиофилизиран хетерополизахарид от червено микроводорасло *Rhodella reticulata* с помощта на електропорация. Два различни вида клетки - туморни и нетуморни бяха третирани с хетерополизахарид самостоятелно или заедно с прилагането на електропорация. Ефектът от третирането беше оценен паралелно: с тест за пролиферация за оценка на клетъчната жизнеспособност и с имунофлуоресцентно оцветяване на цитоскелета за установяване на промени в морфологията. Доказателство за намаляване на жизнеспособността на специфичната клетъчна линия (70% от контролата в случай на третиране на ракова клетъчна линия и само 30% в нетуморни клетки) по начин, зависим от дозата. Тези открития ще събудят допълнителен интерес към хетерополизахаридите като ново противораково лекарство, подходящо за клинични изпитвания.

Hybrid materials parameters influencing the enzyme activity of immobilized cells

L. V. Kabaivanova¹, G. E. Chernev², P. V. Markov³, I. M. Miranda Salvado⁴

Bulgarian Chemical Communications 2014, 46(1), 50 – 55

Abstract: Hybrid materials, synthesized by the sol-gel method, were used as matrices for immobilization of bacterial cells, producers of the enzyme nitrilase. Different methods were employed for structure investigations of the synthesized hybrids: Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), BET and atomic force microscopy (AFM). The influence of the structure of these materials on their properties was followed. The obtained hybrid materials were successfully applied for immobilization of live bacterial cells since cell vitality was kept and enzyme systems preserved their functions in the immobilized systems. The influence of different parameters during the cell immobilization procedure was evaluated for optimization of the immobilization process and enhancement of the activity of the studied enzyme. Most favorable effect on *Bacillus* sp. cells had the matrix with 5 wt. % sepharose and the enzyme activity obtained was 0.45 U ml⁻¹ when the process was carried out at 60°C. Increased specific surface area of the matrix was another factor that led to enhanced nitrilase activity.

Резюме: Хибридни материали, синтезирани по зол-гелен метод, бяха използвани като матрици за имобилизация на бактериални клетки, продуценти на ензима нитрилаза. В структурните изследвания на синтезираните хибриди бяха използвани различни методи: Инфрачервена спектроскопия (FT-IR), BET-анализ и атомно силова микроскопия (AFM). Проследено беше влиянието на структурата на тези материали върху техните свойства. Получените хибридни материали бяха успешно приложени за имобилизация на живи бактериални клетки, при което жизнеността им беше запазена и ензимните им системи запазиха своите функции в имобилизираните системи. Влиянието на различните параметри по време на процедурата на имобилизация беше оценено за оптимизация на процеса и увеличение на ензимната активност на изследвания ензим. Най-благоприятен ефект върху клетките на щам *Bacillus* sp. оказа матрицата с 5 wt.% сефароза и получената

ензимна активност беше 0.45 U ml^{-1} , когато процесът се провежда при 60°C . Увеличената специфична повърхност на матрицата беше още един фактор, водещ до повишена нитрилазна активност.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ПОКАЗАТЕЛ „Г“

Polysaccharides produced by two red algal strains grown in digestate with potential ability of tumor cell inhibition

J. Ivanova^a, B. Nikolova^b, A. Konstantinidou^c, L. Kabaivanova^{c*}

Oxidation Communications 2021, 44(4), 780–789

Abstract: Research on the biological activities and applications of polysaccharides as active biocompounds synthesised by marine unicellular algae, which are, in many cases, released to the surrounding environment – exopolysaccharides, has revealed the possibility of many applications. We have investigated the growth and development of two red microalgae *Porphyridium cruentum* and *Rhodella reticulata*, where the used medium was decolourised with active carbon digestate from anaerobic digestion of agricultural waste – wheat straw. The biomass accumulation for both strains reached a dry weight of 5.2 to $5.5 \pm 0.2 \text{ mg ml}^{-1}$, starting from 0.85 mg ml^{-1} initial concentration for 6 days. Production of heteropolysaccharides was estimated to show increased yield of 0.35 mg ml^{-1} on the 6th day of cultivation for the *Rhodella reticulata* and 0.28 mg ml^{-1} for *Porphyridium cruentum*, compared to 0.25 mg ml^{-1} of the control – growth in a standard medium. The two isolated bioactive substances were then tested using 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H - tetrazolium, inner salt – (MTS test), as potential antitumor agents on two cancer cell lines and a normal one to establish diminishing of cell vitality, mostly when applied to the high metastatic cell line MDA-MB 231- 47%, when electroporation was applied by the heteropolysaccharide synthesised by the *Porphyridium cruentum*, grown in digestate.

Резюме: Изследванията на биологичната активност и приложенията на полизахаридите като активни биосъединения, синтезирани от морски едноклетъчни водорасли, които в много случаи се освобождават в околната среда – екзополisahариди, разкриха възможността за много приложения. Изследвахме растежа и развитието на две червени микроводорасли *Porphyridium cruentum* и *Rhodella reticulata*, където използваната среда беше обезцветен с активен въглен диджестат - остатък от анаеробно разграждане на селскостопански отпадъци – пшенична слама. Натрупването на биомаса за двата щама достигна сухо тегло от 5.2 до $5.5 \pm 0.2 \text{ mg ml}^{-1}$, започвайки от 0.85 mg ml^{-1} първоначална концентрация за 6 дни. Изчислено е, че производството на хетерополизахариди показва увеличен добив от $0,35 \text{ mg ml}^{-1}$ на 6-ия ден от култивирането за *Rhodella reticulata* и 0.28 mg ml^{-1} за *Porphyridium cruentum*, в сравнение с 0.25 mg ml^{-1} от контролния растеж в стандартна среда. След това двете изолирани биоактивни вещества бяха изпитани с 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сулфофенил)-2H-тетразолий, вътрешна сол – (MTS тест), като потенциални антитуморни агенти върху две ракови клетъчни линии и една нормална за установяване на намаляване на

клетъчната виталност, най-вече когато се прилагат към силно метастатичната клетъчна линия MDA-MB 231 - 47%, когато се прилага електропореция и хетерополизахарид, синтезиран от *Porphyridium cruentum*, култивиран в отпаден диджестат.

Bacterial Natural Disaccharide (Trehalose Tetraester): Molecular Modeling and in Vitro Study of Anticancer Activity on Breast Cancer Cells

Biliana Nikolova^{1*}, Georgi Antov^{1,2}, Severina Semkova¹, Iana Tsoneva¹, Nelly Christova³, Lilyana Nacheva³, Proletina Kardaleva⁴, Silvia Angelova⁵, Ivanka Stoineva⁴, Juliana Ivanova², Ivanina Vasileva² and Lyudmila Kabaivanova^{3*}

Polymers 2020, 12, 499; doi:10.3390/polym12020499

Abstract: Isolation and characterization of new biologically active substances affecting cancer cells is an important issue of fundamental research in biomedicine. Trehalose lipid was isolated from *Rhodococcus wratislaviensis* strain and purified by liquid chromatography. The effect of trehalose lipid on cell viability and migration, together with colony forming assays, were performed on two breast cancer (MCF7—low metastatic; MDA-MB231—high metastatic) and one “normal” (MCF10A) cell lines. Molecular modeling that details the structure of the neutral and anionic form (more stable at physiological pH) of the tetraester was carried out. The tentative sizes of the hydrophilic (7.5 Å) and hydrophobic (12.5 Å) portions of the molecule were also determined. Thus, the used trehalose lipid is supposed to interact as a single molecule. The changes in morphology, adhesion, viability, migration, and the possibility of forming colonies in cancer cell lines induced after treatment with trehalose lipid were found to be dose and time dependent. Based on the theoretical calculations, a possible mechanism of action and membrane asymmetry between outer and inner monolayers of the bilayer resulting in endosome formation were suggested. Initial data suggest a mechanism of antitumor activity of the purified trehalose lipid and its potential for biomedical application.

Резюме: Изолирането и характеризирането на нови биологично активни вещества, въздействащи на раковите клетки, е важен въпрос на фундаменталните изследвания в биомедицината. Трехалозният липид е изолиран от щам *Rhodococcus wratislaviensis* и пречистен чрез течна хроматография. Ефектът на трехалозния липид върху жизнеспособността и миграцията на клетките, заедно с анализи за образуване на колонии, бяха извършени върху две клетъчни линии на рак на гърдата (MCF7—слабо метастатична; MDA-MB231—високо метастатична) и една „нормална” (MCF10A). Извършено е молекулярно моделиране, което детайлизира структурата на неутралната и анионна форма (по-стабилна при физиологично рН) на тетраестера. Определят се също и предварителните размери на хидрофилните (7.5 Å) и хидрофобните (12.5 Å) части на молекулата. По този начин се предполага, че използваният трехалозен липид взаимодейства като една молекула. Установено е, че промените в морфологията, адхезията, жизнеспособността, миграцията и възможността за образуване на колонии в ракови клетъчни линии, индуцирани след третиране с трехалозен липид, са зависими от дозата и времето. Въз основа на теоретичните изчисления беше предложен възможен механизъм на действие и асиметрия на мембраната между външния и вътрешния монослой на двуслоя, което води до образуване на ендозома. Първоначалните данни

предполагат механизъм на антитуморна активност на пречистения трехалозен липид и неговия потенциал за биомедицинско приложение.

Simultaneous Biodegradation of Phenol and n-Hexadecane by Cryogel Immobilized Biosurfactant Producing Strain *Rhodococcus wratislawiensis* BN38

Alexander E. Hristov¹, Helly E. Christova¹, Lyudmila V. Kabaivanova¹, Lilyana V. Nacheva¹, Ivanka B. Stoineva² and Petar D. Petrov³

Polish Journal of Microbiology 2016, 65(3), 287–293

Abstract: The capability of the biosurfactant-producing strain *Rhodococcus wratislawiensis* BN38 to mineralize both aromatic and aliphatic xenobiotics was proved. During semicontinuous cultivation 11 g/l phenol was completely degraded within 22 cycles by *Rhodococcus* free cells. Immobilization in a cryogel matrix was performed for the first time to enhance the biodegradation at multiple use. A stable simultaneous hydrocarbon biodegradation was achieved until the total depletion of 20 g/l phenol and 20 g/l n-hexadecane (40 cycles). The alkanotrophic strain *R. wratislawiensis* BN38 preferably degraded hexadecane rather than phenol. SEM revealed well preserved cells entrapped in the heterogeneous super-macroporous structure of the cryogel which allowed unhindered mass transfer of xenobiotics. The immobilized strain can be used in real conditions for the treatment of contaminated industrial waste water.

Резюме: Доказана е способността на произвеждащия биосърфактант щам *Rhodococcus wratislawiensis* BN38 да минерализира ароматни и алифатни ксенобиотици. По време на полунепрекъснато култивиране 11 g/l фенол се разгражда напълно в рамките на 22 цикъла от свободни клетки на *Rhodococcus*. За първи път беше извършено имобилизиране в криогелна матрица, за да се подобри биоразграждането при многократна употреба. Беше постигнато стабилно едновременно биоразграждане на въглеводороди до пълното изчерпване на 20 g/l фенол и 20 g/l n-хексадекан (40 цикъла). Алканотрофният щам *R. wratislawiensis* BN38 преференциално разгражда хексадекан спрямо фенол. SEM разкрива добре запазени клетки, включени в хетерогенната супер-макропореста структура на криогела, което позволява безпрепятствен масов трансфер на ксенобиотици. Имобилизацията на щам може да се използва в реални условия за третиране на замърсени промишлени отпадни води.

New approach for n-hexadecane biodegradation by sol-gel entrapped bacterial cells

Georgi Chernev¹, Nelly Christova², Lyudmila Kabaivanova^{2*} and Lilyana Nacheva²

Ecol Chem Eng S. 2018, 25(2), 243-253

Abstract: In this study sol-gel hybrid materials in the system SiO₂-chitosan (CS) - polyethylene glycol (PEG), as novel structures with potential application in bioremediation were investigated. The organic components - CS and PEG were used as structural modifiers for functionality improvement. The catabolic activity to n-hexadecane of *Pseudomonas aeruginosa* BN10 free and immobilized cells was estimated. The cell immobilization technique was employed to evaluate its efficiency on biodegradation and protective effect from high levels of

hydrocarbons. The characteristics of obtained hybrid materials were investigated via X-ray Diffraction (XRD), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), Scanning Electron Microscopy (SEM) and Atomic-force microscopy (AFM) analyses. The obtained results revealed that the organic part in the synthesized hybrids is important for microstructure and defined properties creation. The rate of n-hexadecane mineralization by the bacterial strain was influenced by variation in cell densities applied in the immobilization procedures. Semi-continuous processes with multiple xenobiotic supplies were carried out. The synthesized by the sol-gel method hybrid matrices proved to be suitable carriers for realizing an effective biodegradation process of n-hexadecane by *Pseudomonas aeruginosa* BN10. Biodegradation of 50 kg/m³ of n-hexadecane was realized by free cells. Significantly greater quantity (150 kg/m³) was mineralized for 15 active cycles by entrapped bacterial cells. Biodegradation process with gradual increase of xenobiotic concentration reaching 30 kg/m³ for 120 h was also accomplished.

Резюме: В това проучване бяха изследвани зол-гел хибридни материали в системата SiO₂-хитозан (CS) - полиетилен гликол (PEG), като нови структури с потенциално приложение в биоремедиацията. Като структурни модификатори за подобряване на функционалността са използвани органичните компоненти - CS и PEG. Оценява се катаболната активност спрямо n-хексадекан на *Pseudomonas aeruginosa* BN10 - свободни и имобилизирани клетки. Техниката на клетъчна имобилизация беше използвана за оценка на нейната ефективност при биоразграждане и защитен ефект от високи нива на въглеводороди. Характеристиките на получените хибридни материали бяха изследвани чрез рентгенова дифракция (XRD), инфрачервена спектроскопия с преобразуване на Фурие (FTIR), сканираща електронна микроскопия (SEM) и атомно-силова микроскопия (AFM). Получените резултати показват, че органичната част в синтезираните хибриди е важна за създаването на микроструктура и определени свойства. Скоростта на минерализация на n-хексадекан от бактериалния щам е повлияна от вариациите в плътността на клетките, приложени в процедурите за имобилизиране. Бяха проведени полунепрекъснати процеси с множество добавяния на ксенобиотици. Синтезираните по зол-гел метода хибридни матрици се оказаха подходящи носители за осъществяване на ефективен процес на биоразграждане на n-хексадекан от *Pseudomonas aeruginosa* BN10. Биоразграждането на 50 kg/m³ n-хексадекан се осъществява от свободни клетки. Значително по-голямо количество (150 kg/m³) е минерализирано за 15 активни цикъла от имобилизираните бактериални клетки. Осъществява се и процес на биоразграждане с постепенно повишаване на концентрацията на ксенобиотика до 30 kg/m³ за 120 h.

Construction of Inorganic and Hybrid Biosorbents for Heavy Metal Ions Removal

Lyudmila Kabaivanova¹, Georgi Chernev², Juliana Ivanova³

Int. J. Bioautomation 2015, 19(4), 473-482

Abstract: Hybrid biosorbents, synthesized by the sol-gel method on the basis of Tetraethylorthosilicate (TEOS) proved to be efficient for the removal of the heavy metal ions from aqueous solutions. The potential use of immobilized in TEOS algal cells of the red microalga *Porphyridium cruentum* and its products – low and high molecular heteropolysaccharides to remove Cu(II), Cd(II) and Ni(II) ions was evaluated. A laboratory

bioreactor was involved in this process. Sol-gel sorbent with TEOS only was used as a control system to the hybrid biosorbents. Their structural characterization was performed using different methods. The maximum adsorption capacities were registered for the biosorbents with immobilized algal biomass and for the preparations with TEOS and high molecular algal heteropolysaccharide: for Cu(II), Cd(II) and Ni(II), they were 18.771 and 21.715 mg Cd·g⁻¹ adsorbent; 16.662 and 17.545 mg Ni·g⁻¹ adsorbent and 40.633 and 34.431 mg Cu·g⁻¹ adsorbent, respectively. The adsorption of toxic Cu(II), Zn(II) and Ni(II) ions in the four types of sorbents proved to be effective. High percent of these ions removal was obtained during the first hours of the adsorption process.

Резюме: Хибридните биосорбенти, синтезирани по зол-гел метод на базата на тетраетилортосиликат (TEOS), се оказаха ефективни за отстраняване на йони на тежки метали от водни разтвори. Беше оценено потенциалното използване на имобилизирани в TEOS клетки от водорасли на червеното микроводорасло *Porphyridium cruentum* и неговите продукти – ниско и високомолекулни хетерополизахариди за отстраняване на Cu(II), Cd(II) и Ni(II) йони. В този процес се използва лабораторен биореактор. Като система за контрол на хибридните биосорбенти е използван зол-гел сорбент само с TEOS. Тяхната структурна характеристика е извършена с помощта на различни методи. Регистрирани са максимални адсорбционни способности за биосорбентите с имобилизирана биомаса от водорасли и за препаратите с TEOS и високомолекулен хетерополизахарид от водорасли: за Cu(II), Cd(II) и Ni(II) те са 18.771 и 21.715 mg Cd·g⁻¹ адсорбент; 16.662 и 17.545 mg Ni·g⁻¹ адсорбент и съответно 40.633 и 34.431 mg Cu·g⁻¹ адсорбент. Адсорбцията на токсични Cu(II), Zn(II) и Ni(II) йони в четирите вида сорбенти се оказва ефективна. Висок процент от отстраняването на тези йони се получава през първите часове от процеса на адсорбция.

Biodegradation of crude oil hydrocarbons by a newly isolated biosurfactant producing strain

Nelly Christova, Lyudmila Kabaivanova*, Lilyana Nacheva, Petar Petrov & Ivanka Stoineva

Biotechnology & Biotechnological Equipment 2019, 33(1), 863–872, <https://doi.org/10.1080/13102818.2019.1625725>

Abstract: New bacterial strain BN66 was isolated by selective enrichment, identified as *Bacillus cereus* and proved to degrade crude oil, together with biosurfactant synthesis. Free and cryogel immobilized *Bacillus cereus* cells were involved in a crude oil degradation process. The studied strain degraded 93% of the aliphatic fraction for 48 h. We immobilized cells in two types of cryogels synthesized from high molar mass polyacrylamide or acrylamide precursors and explored the degradation capability and possibility for re-use of the preparations. Reusability tests revealed that the oil degradation ability of immobilized cells was stable after 47 days (28 °C and shaker speed 120 rpm) and the degradation rate of immobilized cells was maintained at a high level up to the 20th cycle of operation. The matrices obtained from high molar mass polyacrylamide appeared to be more suitable due to their ability to keep the cells within the carrier. The cells immobilized in cryogels exhibited more effective degradation for

22 active cycles at semicontinuous mode of operation compared to only three cycles performed by free cells.

Резюме: Нов бактериален щам BN66 беше изолиран чрез селективно обогатяване, идентифициран като *Bacillus cereus* и доказа, че разгражда суровия петрол, заедно със синтеза на биосърфактант. Свободни и имобилизирани в криогел клетки на *Bacillus cereus* бяха включени в процес на разграждане на суров нефт. Изследваният щам разгражда 93% от алифатната фракция за 48 часа. Ние имобилизирахме клетки в два вида криогелове, синтезирани от прекурсори на полиакриламид или акриламид с висока моларна маса и проучихме способността за разграждане и възможността за повторна употреба на препаратите. Тестовите за повторна употреба разкриха, че способността за разграждане на нефта от имобилизираните клетки остава след 47 дни (28 °C и скорост на разклащане 120 rpm), като скоростта на разграждане на имобилизираните клетки се поддържа на високо ниво до 20-ия цикъл на работа. Матриците, получени от полиакриламид с висока моларна маса, изглеждат по-подходящи поради способността им да задържат клетките в носителя. Клетките, имобилизирани в криогелове, показват по-ефективно разграждане за 22 активни цикъла при полунепрекъснат режим на работа в сравнение само с три цикъла, извършени от свободните клетки.

Physiological Responses to Oxidative Stress of Different *Chlorella vulgaris* Isolates

Dilyana Doneva¹, Juliana Ivanova¹, Lyudmila Kabaivanova^{2*}

Int. J. Bioautomation, 2019, 23(4), 447-460

Abstract: Oxidizing agents, notably hydrogen peroxide (H₂O₂), are increasingly used in a number of applications. Their manner of action on algae was investigated in this work. Different concentrations of H₂O₂ and silver ions were applied to the algal cultures to follow the effect of their action in antarctic and mesophilic isolates of the green alga *Chlorella vulgaris*. Oxidative stress-induced physiological responses manifested by changes in the photosynthetic apparatus and antioxidant enzymes were estimated. The algae from the antarctic region appeared to be less resistant to oxidative stress than their mesophilic counterparts, concerning growth after treatment with higher concentrations of the reagent. The increased concentration (0.05%) lead to raise of activity and isoenzyme number of catalase (CAT) in both *C. vulgaris* strains. The isoenzyme activity of peroxidase (POX) decreased and disappeared in the antarctic isolate. At the same time the highest concentration (0.08%) provoked restoration of POX activity in the mesophylic one. Decrease in superoxide dismutase (SOD) activity was registered and this effect was more intensive in the moderate and fast mobile isoenzymes. Isoenzyme profile at 0.08% reagent concentration for the mesophylic isolate was similar with this at 0.05% for the antarctic isolate and a fourth isoenzyme appeared.

Резюме: Окислителите, по-специално водородният пероксид (H₂O₂), все повече се използват в редица приложения. Начинът им на действие върху водораслите беше изследван в тази работа. Различни концентрации на H₂O₂ и сребърни йони бяха приложени към култури от водорасли, за да се проследи ефектът от тяхното действие в антарктически и мезофилни изолати на зеленото водорасло *Chlorella vulgaris*. Бяха оценени предизвиканите от оксидативен стрес физиологични реакции, проявяващи се чрез промени във фотосинтетичния апарат и антиоксидантните ензими. Водораслите от

антарктическият регион изглеждат по-малко устойчиви на оксидативен стрес от мезофилните такива, що се отнася до растежа след третиране с по-високи концентрации на реагента. Повишената концентрация (0.05%) води до повишаване на активността и изоензимния брой на каталазата (CAT) и в двата щама *C. vulgaris*. Изоензимната активност на пероксидазата (POX) намалява и изчезва в антарктическият изолат. В същото време най-високата концентрация (0.08%) провокира възстановяване на активността на POX в мезофилната. Регистрирано е понижение на активността на супероксид дисмутазата (SOD), като този ефект е по-интензивен при умерено и бързо подвижните изоензими. Изоензимният профил при концентрация на реагента 0.08% за мезофилния изолат е сходен с този при 0.05% за антарктическият изолат и се появява четвърти изоензим.

Temperature and Irradiance Effects on *Rhodella reticulata* Growth and Biochemical Characteristics

J. G. Ivanova^a, L. V. Kabaivanova^{b*}, and G. D. Petkov^a

Russian Journal of Plant Physiology 2015, 62(5), 647–652

Abstract: The red microalga *Rhodella reticulata*, a potential source of bioactive substances, was the subject of study of the irradiance and temperature effects on growth rate and biochemical composition of algal biomass. The optimum temperature for growth decreased from 28 to 26°C with increasing light intensity from 260 to 520 $\mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$. The maximal growth rate was 0.21/day at 28°C and lower light intensity (260 $\mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$). Variations in these parameters also affected the fatty acid productivity, and proteins and carbohydrates content. At 34°C and high light intensity the quantity of carbohydrates was 1.16-fold higher than the quantity at the optimal temperature and low light intensity. Protein content was the highest at lower temperatures for both light intensities. Fatty acid profile showed the highest percent for the polyunsaturated eicosapentaenoic acid (EPA) at 28°C and both light intensities (46% from the whole fatty acid content), an important feature for this strain. This is a prerequisite for use of EPA as a supplement in food industry.

Резюме: Червеното микроводорасло *Rhodella reticulata*, потенциален източник на биоактивни вещества, е обект на изследване на въздействието на облъчването и температурата върху скоростта на растеж и биохимичния състав на биомасата от водорасли. Оптималната температура за растеж намалява от 28 на 26°C с увеличаване на интензитета на светлината от 260 на 520 $\mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$. Максималната скорост на растеж е 0.21/ден при 28°C и по-нисък интензитет на светлината (260 $\mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$). Вариациите в тези параметри също повлияха на продуктивността на мастни киселини и съдържанието на протеини и въглехидрати. При 34°C и висока интензивност на светлината количеството въглехидрати е 1.16 пъти по-високо от количеството при оптимална температура и ниска интензивност на светлината. Съдържанието на протеин е най-високо при по-ниски температури и за двата интензитета на светлината. Профилът на мастни киселини показва най-висок процент за полиненаситената ейкозапентаенова киселина (EPA) при 28°C и двата интензитета на светлина (46% от цялото съдържание на мастни киселини), важна характеристика за този щам. Това е предпоставка за използване на EPA като добавка в хранително-вкусовата промишленост.

Trehalose Lipid Biosurfactant Reduced Cancer Cell Viability but did not Affect the Isometric Contraction of Rat Mesenteric Arteries in vitro

Boris Kadinov, Biliana Nikolova, Iana Tsoneva, Severina Semkova, Lyudmila Kabaivanova, Daniela Dimitrova

Int. J. Bioautomation 2020, 24(1), 79-86

Abstract: Trehalose lipid biosurfactant from *Nocardia farcinica* strain is a naturally derived substance with potent anticancer activity. The increasing interest in naturally derived substances-based modality of cancer treatment requires investigations of the possible adverse effects of these substances, including the effects on vasculature. Therefore the present study was designed to investigate the effect of Trehalose lipid on isometric contraction of isolated rat mesenteric arteries. The contractile responses of arteries under Trehalose lipid was studied using wire myography for small blood vessels. The isometric contractions of rat mesenteric artery rings with intact endothelium were examined. The effect of this biosurfactant was assessed in arteries precontracted with 42 mM KCl as a vascular smooth muscle depolarizing stimulus. The results showed that Trehalose lipid (75 μ M) failed to change high K⁺ -induced contractions. The observed lack of effect of Trehalose lipid biosurfactant on the contractility of rat mesenteric arteries in vitro together with finding of reduced cancer cells viability makes it suitable for potential medical application.

Резюме: Трехалозен липиден биосърфактант от щам *Nocardia farcinica* е естествено получено вещество с мощна противоракова активност. Нарастващият интерес към модалността на лечение на рак, базирана на естествени вещества, изисква изследвания на възможните неблагоприятни ефекти на тези вещества, включително ефектите върху васкулатурата. Следователно настоящото изследване е предназначено да изследва ефекта на трехалозния липид върху изометричното свиване на изолирани мезентериални артерии на плъх. Контрактилните реакции на артериите под трехалозен липид са изследвани с помощта на миография за малки кръвоносни съдове. Изследвани са изометричните контракции на пръстените на мезентериалната артерия на плъх с непокътнат ендотел. Ефектът на този биосърфактант беше оценен в артерии, предварително свити с 42 mM KCl като деполяризиращ съдов гладкомускулен стимул. Резултатите показват, че трехалозният липид (75 μ M) не успява да промени силно индуцираните от K⁺ контракции. Наблюдаваната липса на ефект на трехалозния липиден биосърфактант върху контрактилитета на мезентериалните артерии на плъх in vitro, заедно с установяване на намалена жизнеспособност на раковите клетки, го прави подходящ за потенциално медицинско приложение.

Addition of microbial inoculua as a way for compost improvement by enhancing the activities of hydrolytic enzymes

Adriana Goushterova¹, Lilyana Nacheva¹, Nikolai Dinev², Lyudmila Kabaivanova^{1*}

Baltica 2020, 33(9), 18-35

Abstract: Strategies to improve compost quality will be continuously needed. The main components of composting technology include organic materials and microorganisms – the agents of this process. In this work we studied how the addition of a microbial suspension of fungal strains, isolated fungi and bacteria from vegetable waste as plant substrate, as well as of thermophilic actinomycetes isolated from soil, could improve enzymatic activity and hence biodegradability and compost quality. The levels of activities of key enzymes involved in the biodegradation of plant waste products were studied and a collection of microorganisms was created, capable of assimilating plant waste as only carbon and nitrogen source and suitable to be added to the compost. The results indicate that the activities of cellulose-degrading enzymes change after treatment with addition of different inocula as follows: cellulose activity- *Trichoderma longebrahiatum* > *Trametes versicolor* ≈ *Trichoderma viridae* ≈ F4 > F2 > F1 ≈ P6 > P1 ≈ P5 > A3 ≈ A5 > Control; endoxylanase- *Trichoderma longebrahiatum* ≈ *Trametes versicolor* > *Trichoderma viridae* > *Rhizopus oryzae* ≈ P4 ≈ F6 ≈ P2 ≈ P1 ≈ A3 > Control, where F are mesophilic fungal isolates; P-bacterial isolates; A-thermophilic actinomycete isolates.

Резюме: Непрекъснато ще са необходими стратегии за подобряване на качеството на компоста. Основните компоненти на технологията за компостиране включват органични материали и микроорганизми – агенти на този процес. В тази работа проучихме как добавяне на микробна суспензия от гъбни шамове, изолирани гъби и бактерии от растителни отпадъци като растителен субстрат, както и изолирани термофилни актиномицети от почвата, може да подобри ензимната активност и следователно биоразградимостта и качество на компоста. Нивата на активност на ключови ензими, участващи в биоразграждането на растителни отпадъчни продукти е изследвано и е събрана колекция от микроорганизми, способни да усвояват растителните отпадъци като единствен въглероден източник и източник на азот, които са подходящи за добавяне към компоста. Резултатите сочат, че активността на ензимите, разграждащи целулозата, се променя след третиране с добавяне на различни инокулуми, както следва: целулозна активност- *Trichoderma longebrahiatum* > *Trametes versicolor* ≈ *Trichoderma viridae* ≈ F4 > F2 > F1 ≈ P6 > P1 ≈ P5 > A3 ≈ A5 > Контрол; ендоксилаза- *Trichoderma longebrahiatum* ≈ *Trametes versicolor* > *Trichoderma viridae* > *Rhizopus oryzae* ≈ P4 ≈ F6 ≈ P2 ≈ P1 ≈ A3 > Контрол, където F са мезофилни гъбни изолати; P-бактериални изолати; A-термофилни актиномицетни изолати.

Kalman Filter Based Newton Extremum Seeking Control for Maximum Gases

Production Rates of Anaerobic Digestion Process

Yang Tian, Maobo Hu, Haoping Wang, Ivan Simeonov, Lyudmila Kabaivanova, Nicolai Christov

Information Technology and Control 2020, 49(4), 455-463, doi 10.5755/j01.itc.49.4.25367

Abstract: This paper proposes a Kalman filter (KF) based Newton extremum seeking control (NESC) to maximize production rates of hydrogen and methane in anaerobic digestion process. The Kalman filtering algorithm is used to obtain more accurate gradient and Hessian estimates which makes it possible to increase the convergence speed to the extremum and to eliminate

input and output steady-state oscillations. The simulation examples demonstrate the performances of the proposed approach.

Резюме: Този труд предлага базиран на филтър на Калман (KF) контрол на търсенето на екстремум на Нютон (NESC) за максимизиране на производствените нива на водород и метан в процеса на анаеробно разграждане. Алгоритъмът за филтриране на Калман се използва за получаване на по-точни градиентни и Хесиански оценки, което прави възможно увеличаването на скоростта на конвергенция до екстремума и елиминирането на входни и изходни осцилации в стационарно състояние. Примерите за симулация демонстрират характеристиките на предложениия подход.

Biomethane production using ultrasound pretreated maize stalks with subsequent microalgae cultivation

Venelin Hubenov, Ramiro Ariel Carcioch, Juliana Ivanova, Ivanina Vasileva, Krasimir Dimitrov, Ivan Simeonov & Lyudmila Kabaivanova*

Biotechnology & Biotechnological Equipment 2020, 34(1), 800–809

Abstract: This study utilized a renewable energy source, agricultural waste, in anaerobic digestion (AD) at appropriate conditions to obtain biogas and biomethane as an energy carrier. Maize stalks underwent ultrasound (US) pre-treatment for better accessibility for microorganisms, as lignocelluloses have a stable structure, insoluble in water and resist both mechanical and enzymatic attack. The digestate after an anaerobic digestion process was used for cultivation of algae after adsorption with activated carbon for clarification. Photosynthetic microalgae have industrial and economic perspectives, so their low-cost cultivation has a great potential for many applications. The results showed the impact of US pre-treatment of maize stalks as a sole substrate and codigested with algal biomass. The total yields were 1116 cm³/L, 1350.5 cm³/L and 1293.25 cm³/L for the untreated, ultrasonically pre-treated and microwaved maize stalks. The possibility of accumulating algal biomass using anaerobic digestate as a medium was demonstrated. US pretreatment (400 W) showed high efficiency with respect to the extractives obtained per unit of energy input. Addition of 4 g/L of microalgal biomass as a co-substrate led to an increase in the biogas yield compared to native stalks. A small closed circle system, starting from anaerobic digestion of lignocellulosic substrates followed by microalgae cultivation in the digestate and subsequent return of microalgal biomass back in the bioreactor as a co-substrate was realized, encouraging circular economy. The suggested scheme is a simple and low-cost technology, as the substrate used is freely available and renewable, and algae proved to grow in a waste effluent as medium.

Резюме: Това проучване използва възобновяем източник на енергия, селскостопански отпадъци, в анаеробно разграждане (AD) при подходящи условия за получаване на биогаз и биометан като енергиен носител. Царевичните стъбла са подложени на предварителна обработка с ултразвук (US) за по-добра достъпност за микроорганизми, тъй като лигноцелулозите имат стабилна структура, неразтворими във вода и са устойчиви както на механични, така и на ензимни атаки. Остатъкът след процес на анаеробно разграждане се използва за култивиране на водорасли след адсорбция с

активен въглен за избистряне. Фотосинтезиращите микроводорасли имат промишлени и икономически перспективи, така че тяхното евтино отглеждане има голям потенциал за много приложения. Резултатите показаха въздействието на предварителната обработка с ултразвук на царевични стъбла като единствен субстрат и смесени с биомаса от водорасли. Общите добиви бяха 1116 cm³/L, 1350.5 cm³/L и 1293.25 cm³/L за нетретираните, предварително третирани с ултразвук и с микровълни царевични стъбла. Беше демонстрирана възможността за натрупване на биомаса от водорасли с използване на анаеробна биомаса като среда. Предварителната обработка с ултразвук (400 W) показва висока ефективност по отношение на извлечените вещества, получени за единица вложена енергия. Добавянето на 4 g/L биомаса от микроводорасли като ко-субстрат доведе до увеличаване на добива на биогаз в сравнение с нативните стъбла. Реализирана е система с малък затворен кръг, започваща от анаеробно разграждане на лигноцелулозни субстрати, последвано от култивиране на микроводорасли в остатъка и последващо връщане на биомаса от микроводорасли обратно в биореактора като ко-субстрат, насърчавайки кръговата икономика. Предложената схема е проста и евтина технология, тъй като използваният субстрат е свободно достъпен и възобновяем, а водораслите доказаха, че растат в отпаден диджестат като среда.

Microbial biodegradation as an option for waste utilization during long-term manned space missions

Hr. Najdenski¹, V. Hubenov¹, I. Simeonov¹, V. Kussovski¹, L. Dimitrova¹, P. Petrova¹, P. Angelov², L. Kabaivanova^{1*}

Bulgarian Chemical Communications 2020, 52(3), 379-386

Abstract: Planned space flights in foreseeable future to Mars pose many important issues to be solved by nowadays science, especially the problem of organic wastes accumulated in large quantities. The flight from Earth to Mars takes about 520 days. The crew possibly could consist of 6 cosmonauts, each of them needing daily: oxygen (1 kg of liquid), water (1-2 litres), food (2-3 kg). The total weight is about 5 kg/day or 30 kg/day for the entire crew. During long-term manned missions, the wastes are prohibited to be disposed of in space. They must be recycled. It is known that specific bacteria are able to convert waste substrates into usable nutrients and minerals. The enormous challenge is: reducing the volume of wastes to generate liquid and gaseous fractions which could be used in the production of food, water and oxygen. Simultaneously, some biogas is obtained as a source of energy. We present the development of a process of biodegradation of cellulose containing substrates similar to personal hygiene materials for cosmonauts by selected non-pathogenic bacteria. Experiments were conducted in terrestrial conditions where a degree of biodegradation of 72% of cellulose containing substrates at anaerobic, mesophilic conditions was realized. The selected bacterial community was genetically identified. The most abundant species were *Bacteroides oleiciplenus*, *Clostridium butyricum*, and *Ruminiclostridium papyrosolvens*. Concentration and profile of volatile fatty acids accompanying the biodegradation process in a bioreactor were also followed.

Резюме: Планираните космически полети в обозримо бъдеще до Марс поставят много важни въпроси, които трябва да бъдат решени от съвременната наука, особено проблемът с натрупаните в големи количества органични отпадъци. Полетът от Земята до Марс отнема около 520 дни. Екипажът евентуално би могъл да се състои от 6 космонавта, като всеки от тях се нуждае ежедневно от: кислород (1 кг течност), вода (1-2 литра), храна (2-3 кг). Общото тегло е около 5 кг/ден или 30 кг/ден за целия екипаж. По време на дългосрочни пилотирани мисии, отпадъците са забранени за изхвърляне в космоса. Те трябва да бъдат рециклирани. Известно е, че специфични бактерии са в състояние да преобразуват отпадните субстрати в използваеми хранителни вещества и минерали. Огромното предизвикателство е: намаляване на обема на отпадъци за генериране на течни и газообразни фракции, които могат да се използват в производството на храна, вода и кислород. Едновременно с това се получава известно количество биогаз като източник на енергия. Представяме развитието на процес на биоразграждане на съдържащи целулоза субстрати, подобни на материалите за лична хигиена за космонавти от избрани непатогенни бактерии. Експериментите са проведени в земни условия, където степента на биоразграждане на целулозата е 72% на целулозосъдържащи субстрати при анаеробни, мезофилни условия. Избраното бактериално съобщество беше генетично идентифицирано. Най-разпространените видове са *Bacteroides oleiciplenus*, *Clostridium butyricum* и *Ruminiclostridium rapyrosolvens*. Концентрацията и профила на летливите мастни киселини е определен в хода на процеса на биоразграждане в биореактора.

Distribution of Soil Microorganisms in Field under Potatoes due to Fertilizer and Organics

Stefan Shilev¹, I. Mitova², V. Kuncheva², N. Dinev², Lyudmila Kabaivanova^{3*}

Indian Journal of Agricultural Research 2022, 56(4), 401-407

Abstract: Using organic manure derived from animal or vegetable matter is often associated with balanced crop production. The influence of organics and fertilizers on soil sustainability during cultivation of potatoes in field was studied. Vegetable experiment comprising 10 years (2011-2021), having a control variant (no fertilization), independent mineral, organics (compost) and their combination (50:50%). Changes in the amount and distribution of microbial groups in experimental variants and associated untreated controls were evaluated. Total bacterial number, spore-forming bacteria, fungi, nitrogen-utilizing bacteria and actinomycetes were assessed. Applied organics and fertilizers had statistically proven a positive effect on growth parameters of potatoes. Organics and fertilizers supplied with mineral and foliar feeding registered taller plants with increased number of branches, number and mass of leaves and stem and root masses, compared to potatoes with organic and organic-mineral combination. Application of compost led to a significant increase in populations of all physiological groups of microorganisms excluding spore-forming bacteria and bacteria utilizing mineral nitrogen, which is a good indicator of increased soil microbial activity in respective treatments. Mineral fertilization had a positive effect on total number of bacteria and on absorption of mineral nitrogen. The treatment in variant (50:50 %) at rhizosphere soil was associated with organic manure application and at non-rhizosphere soil with mineral fertilizer.

Резюме: Използването на органичен тор, получен от животински или растителен материал, често се свързва с балансирано производство на култури. Изследвано е влиянието на органичните вещества и торовете върху устойчивостта на почвата при отглеждане на картофи в полето. Проведен е опит със зеленчуци за 10 години (2011-2021), имащ контролен вариант (без торене), самостоятелни минерални, органични (компост) и тяхната комбинация (50:50%) торове. Бяха оценени промените в количеството и разпределението на микробните групи в експерименталните варианти и свързаните нетретиран контроли. Бяха оценени общият бактериален брой, спорообразуващите бактерии, гъбите, азот-фиксиращите бактерии и актиномицетите. Приложените органика и торове имат статистически доказан положителен ефект върху растежните параметри на картофите. Органичните и торовете, снабдени с минерално и листно подхранване, допринасят за по-високи растения с увеличен брой разклонения, брой и маса на листата и стъблената и кореновата маса, в сравнение с картофите с органична и органо-минерална комбинация. Прилагането на компост доведе до значително увеличаване на популациите на всички физиологични групи микроорганизми, с изключение на спорообразуващите бактерии и бактериите, използващи минерален азот, което е добър показател за повишена почвена микробна активност при съответните обработки. Минералното торене има положителен ефект върху общия брой бактерии и върху усвояването на минерален азот. Третирането във вариант (50:50 %) при ризосферна почва беше свързано с внасяне на органичен тор, а при неризосферна почва с минерален тор.

Volumes ratio optimization in a cascade anaerobic digestion system producing hydrogen and methane

Elena Chorukova¹, Ivan Simeonov¹ and Lyudmila Kabaivanova^{1*}

Ecol Chem Eng S. 2021, 28(2), 183-200

Abstract: As focus of humans has turned to renewable energy, the role of anaerobic digestion has started to become economically viable. Reducing the volume of agro-wastes for the generation of gaseous and liquid fractions with energy carriers and valuable products is an enormous challenge. A two-stage anaerobic digestion process consisting of hydrogenic stage followed by methanogenic stage was studied in a laboratory scale. Five simple nonlinear models of this continuous cascade process were studied in order to determine the optimal ratio of working volumes of bioreactors, in view of maximising energy production. This ratio was reported for all adopted models. The optimal ratio (maximal energy production criterion) depends of the adopted mathematical model. Static characteristics of both bioreactors were obtained using Symbolic toolbox of Matlab. Numerical experiments concerning dynamics of the main variables of both bioreactors for these models using Simulink of Matlab are performed for different step changes of the dilution rate of the first bioreactor, together with the influence of the substrate (acetate) inhibition for one of the models. The value of the constant of inhibition plays an important role on the admissible interval of the dilution rate. The developed idea could serve for optimally designed experiments of anaerobic digestion for production of hydrogen and methane from lignocelluloses wastes (wheat straw) in two phase process.

Резюме: Тъй като фокусът на хората се насочи към възобновяемата енергия, ролята на анаеробното разграждане започна да става икономически значимо. Намалването на обема на агроотпадъците за генериране на газообразни и течни фракции с енергоносители и ценни продукти е огромно предизвикателство. Двуетапен процес на анаеробно разграждане, състоящ се от водороден етап, последван от метаногенен етап, беше изследван в лабораторен мащаб. Изследвани са пет прости нелинейни модела на този непрекъснат каскаден процес, за да се определи оптималното съотношение на работните обеми на биореакторите, с оглед максимизиране на производството на енергия. Това съотношение беше отчетено за всички приети модели. Оптималното съотношение (критерий за максимално производство на енергия) зависи от възприетия математически модел. Статичните характеристики на двата биореактора бяха получени с помощта на Symbolic toolbox на Matlab. Проведени са числени експерименти относно динамиката на основните променливи на двата биореактора за тези модели, използващи Simulink на Matlab, за различни стъпкови промени на скоростта на разреждане на първия биореактор, заедно с влиянието на субстратното (ацетатно) инхибиране за един от моделите. Стойността на константата на инхибиране играе важна роля за допустимия интервал на скоростта на разреждане. Разработената идея може да послужи за оптимално проектирани експерименти на анаеробно разлагане за производство на водород и метан от лигноцелулозни отпадъци (пшенична слама) в двуфазен процес.