



**БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ  
ИНСТИТУТ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ „СТЕФАН АНГЕЛОВ“**

**НИКОЛИНА АТАНАСОВА АТАНАСОВА**

**РАЗГРАЖДАНЕ НА ПЛАСТМАСИ ОТ ТЕРМОФИЛНИ И ХАЛОФИЛНИ  
БАКТЕРИИ, ИЗОЛИРАНИ ОТ БЪЛГАРСКИ ЕКСТРЕМНИ НИШИ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

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

Област на висше образование: 4 Природни науки, математика и информатика

Професионално направление: 4.3 Биологически науки

(Микробиология)

**Научен ръководител: проф. Маргарита Камбурова, дн**

**Членове на научното жури:**

Проф. Пенка Петрова, дн  
Акад. Атанас Павлов, дн  
Проф. Петя Христова, д-р  
Проф. Велизар Гочев, д-р  
Доц. Анна Томова, д-р

София, 2023



**БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ  
ИНСТИТУТ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ „СТЕФАН АНГЕЛОВ“**

**НИКОЛИНА АТАНАСОВА АТАНАСОВА**

**РАЗГРАЖДАНЕ НА ПЛАСТМАСИ ОТ ТЕРМОФИЛНИ И ХАЛОФИЛНИ  
БАКТЕРИИ, ИЗОЛИРАНИ ОТ БЪЛГАРСКИ ЕКСТРЕМНИ НИШИ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

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

Област на висше образование: 4 Природни науки, математика и информатика  
Професионално направление: 4.3 Биологически науки  
(Микробиология)

**Научен ръководител: проф. Маргарита Камбурова, дн**

**Членове на научното жури:** Проф. Пенка Петрова, дн  
Акад. Атанас Павлов, дн  
Проф. Петя Христова, д-р  
Проф. Велизар Гочев, д-р  
Доц. Анна Томова, д-р

София, 2023

Дисертационният труд съдържа 180 страници, 38 фигури и 23 таблици. В библиографската справка са включени 187 литературни източника. Експерименталната работа е извършена в лаборатория „Екстремофилни микроорганизми“ на Институт по микробиология „Стефан Ангелов“, БАН.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на 28.03.2023 г. на разширено заседание на национален семинар по „Обща микробиология“ към Институт по микробиология „Стефан Ангелов“ – БАН.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на открито заседание пред научно жури на ..... от..... в заседателната зала на Институт по микробиология „Стефан Ангелов“ – БАН.

Материалите по защитата са на разположение в кабинета на научния секретар на Институт по микробиология „Стефан Ангелов“ – БАН.

*Изказвам благодарност на научния си ръководител проф. Маргарита Камбурова за подкрепата, търпението, напътствията и съветите при осъществяване на изследванията и оформянето на дисертационния труд.*

*Благодаря на колегите си от лаборатория „Екстремофилни бактерии“ за оказаната помощ, както и на доц. Стоицова и доц. Паунова-Кръстева за съдействието им при изследванията със СЕМ.*

## **Използвани съкращения**

AZCL - azurin crosslinked

DTT – дитиотреитол

EDTA – етилендиаминтетраоцетна киселина

GPC – гел пермеационна хроматография

PMSF – фенилметилсулфонид флуорид

pNPB - пара-нитрофенил бутират

pNPP – пара-нитрофенил палмитат

NBS – N-бромсукцинимид

NaLS – натриев лаурил сулфат

HDPE – полиетилен с висока плътност

LDPE – полиетилен с ниска плътност

SDS – натриев додецил сулфат

МК-К – съобщество от горещ извор Марикостиново, култивирано в отсъствие на пластмаса

МК-ПКЛ – съобщество от горещ извор Марикостиново, култивирано в присъствие на поликапролактон

МК-ПС – съобщество от горещ извор Марикостиново, култивирано в присъствие на полистирен

ПВА/PVA – поливинил алкохол

ПВХ/PVC – поливинил хлорид

ПЕ/PE – полиетилен

ПЕС – полиетерсулфон

ПКЛ/PCL – поликапролактон

ПП/PP - полипропилен

ПС/PS – полистирен

ПХБ – полихидроксibuтират

C1-К – халофилно съобщество от проба 1, култивирано в отсъствие на пластмаса

C2-К – халофилно съобщество от проба 2, култивирано в отсъствие на пластмаса

C1-ПКЛ – халофилно съобщество от проба 1, култивирано в присъствие на поликапролактон

C2-ПКЛ – халофилно съобщество от проба 2, култивирано в присъствие на поликапролактон

C1-ПВА – халофилно съобщество от проба 1, култивирано в присъствие на поливинил алкохол

C2-ПВА – халофилно съобщество от проба 2, култивирано в присъствие на поливинил алкохол

SEM/SEM – сканиращ електронен микроскоп

## Увод

Масовото производство на пластмаси постепенно води до навлизането им в почти всички области на човешкия живот, правейки го по-лесен, по-безопасен и по-цветен. Количеството произведени пластмаси се е увеличило повече от двадесет пъти между 1964 г. и 2020 г., очаква се да се удвои до 2035 г. в сравнение с 2020 и да се увеличи почти до четири пъти до 2050 г. Предимствата на пластмасите като лекота, ниска цена, висока издръжливост и инертност срещу много химикали, физични фактори и микробни атаки обуславят разнообразните им приложения и допринасят за икономическия растеж. От друга страна обаче, инертността на материалите, от които се произвеждат пластмасите, им позволява да останат непокътнати за стотици години. Трудното им разграждане и бързото им акумулиране в околната среда доведоха до обществена тревога относно замърсяването с тях. Пластмасите са една от основните причини за натрупването на екологично замърсяващи отпадъци, влошаването на околната среда и изменението на климата, изчерпването на природните ресурси, намаляване на биоразнообразието, увеличаване на канцерогенните заболявания при хората. Прекомерната употреба на пластмаси и нарастващия натиск върху депата за изхвърляне на пластмасови отпадъци определя огромния интерес през последните няколко години към възможността за биоразграждането им. Много надежди за тяхното рециклиране се възлагат на микроорганизмите. Необикновените свойства на екстремозимите и метаболитните характеристики на техните продуценти предлагат нов подход за биоремедиация на замърсени екстремни местообитания или развитието на нови процеси за компостиране, чрез които да се допринесе за разрешаването на един от най-големите обществени проблеми, а именно замърсяването с пластмаса.

## **Цел и задачи**

**Цел** на настоящия дисертационен труд е да се проучи способността на екстремофилни бактерии, изолирани от български екстремни ниши, ефективно да разграждат различни видове пластмаси.

### **Задачи:**

1. Набогатяване на микробни съобщества от горещи извори и солници в среди с различни видове пластмаса като единствен въглероден източник.
2. Скрининг на екстремофилните щамове от наличните сбирки на лабораторията (термофили и халофили) за растеж в хранителни среди с различни видове пластмаси като въглероден източник.
3. Филогенетичен и молекулярен анализ на микробни съобщества.
4. Изолиране на чисти щамове от микробните съобщества.
5. Скрининг на микробните съобщества и изолати за естеразна ензимна активност и избор на перспективен разграждащ щам за следващи изследвания.
8. Оптимизиране на физичните и химични параметри на средата за оптимално микробно разграждане на избрани пластмаси.
9. Определяне на кинетични характеристики и ефективност на разградния процес при чисти и смесени микробни култури.
10. Оценка на промените в пластмасовата повърхност и образуването на биофилми чрез сканираща електронна микроскопия.
11. Пречистване и характеризиране на свойствата на чист разграждащ ензим, изолиран от активен по отношение на избрана пластмаса щам.
12. Определяне на механизма на действие на разграждащия ензим върху субстрата.

## **Методи**

### **1. Събиране на проби от български екстремни ниши**

#### **1.1. Събиране на проби от горещи извори и набогатяване на съобществото**

Проби, съдържащи пластмасови остатъци (чашки от кафе, бутилки, тарелки, детски играчки, опаковки от лекарства) и води в близост до пластмасовите отпадъци бяха събрани от пет български горещи извора, разположени в югозападна България: Рупи, Левуново, Марикостиново, Симитли и Долно Осеново.

#### **1.2. Събиране на проби от солени местообитания и набогатяване на културите**

Два вида проби, луга и кал, съдържащи пластмасови остатъци, бяха събрани от Атанасовско езеро (Бургаски солници) (33% соленост), и Поморийски солници (34% соленост) в стерилни стъклени бутилки и съхранявани в термостатна чанта на 4°C по време на транспортирането им до лабораторията.

### **2. Определяне на естеразна активност**

Ензимната активност беше определена чрез измерване на естеразната активност. Хидролизата на р-нитрофенил палмитат (pNPP) като субстрат беше определена спектрофотометрично. Една единица естеразна активност беше определена като количеството ензим, необходимо за освобождаването на 1  $\mu\text{M}$  р-нитрофенол за една минута при описаните условия. Моларния екстинкционен коефициент за р-нитрофенол при рН 7.5 беше  $3.39 \times 10^3/\text{M}$ .

### **3. Определяне на концентрацията на белтък**

Белтъчното съдържание беше определяно по метода на Lowry.

### **4. Метагеномен анализ на микробните съобщества**

Метагеномните анализи бяха извършени в Eurofins Genomics Europe, Ebersberg, Germany. ДНК беше извлечена с търговски кит в съответствие с инструкциите на производителя. 16S рРНК гени бяха PCR амплифицирани от екстрахираната ДНК, използвайки специфични праймери и анализирани чрез Amplicon sequencing на платформата Illumina MiSeq.

### **5. Сканираща електронна микроскопия (SEM)**

### **6. Изолиране на чисти щамове от термофилното съобщество и скрининг на изолатите**

За изолиране на чисти щамове всяка колония беше разсята трикратно и за по-нататъшна работа бяха избрани единични колонии с различен външен вид. Извършена беше процедура за скрининг за ПКЛ разграждащи бактерии. Биоразграждащата активност беше отчетена чрез формирането на ясни зони около растежните петна.

## **7. Филогенетичен анализ на изолираните бактерии**

Петрита, съдържащи чисти щамове, бяха изпратени за филогенетичен анализ в Macrogen Europe BV, Amsterdam, Netherland, където бяха секвенирани пълните генни секвенции на 16S rRNA чрез използване на универсални бактериални праймери 27F и 1492R. Изолатите бяха секвенирани и идентифицирани в Макроген.

## **8. Оптимизация на параметрите за разграждане на ПКЛ при термофили**

**8.1. Температурен оптимум-** беше измерен в областта 50-65°C

**8.2. рН оптимум-** беше измерен в областта от 6 до 9

**8.3. Влияние на концентрацията на ПКЛ** – беше определена при концентрация на субстрата от 0.1 до 0.7%.

## **9. Измерване на бактериалната биомаса**

Измерването на оптичната плътност или микроскопско броене при МК-ПКЛ се затрудняваше от образуването на видими биофилми на пластмасовата повърхност въпреки че беше използвано в началните етапи на нашата работа за приблизителна оценка на растежа. При характеризиране на биоразградния процес обаче микробният растеж беше оценен чрез измерване на концентрацията на белтък в културалната течност и в клетките, отстранени от повърхността на ПКЛ след обработка с SDS.

## **10. Измерване на гравиметричното тегло**

Биоразграждането на ПКЛ беше определено чрез гравиметричен метод за 4 седмици,. Намалването на теглото на перлите ПКЛ за един ден (скорост на разграждане) беше изчислено на базата на намалването на тяхното гравиметрично тегло в съответствие с формулата:  $DR = (W_0 - W)/7$ , където DR е скоростта на разграждане,  $W_0$  е теглото на перлите ПКЛ в края на предишната седмица (мг),  $W$  е теглото на перлите в края на настоящата седмица.

**11. Определяне на въглехидрат разграждаща активност на *B. thermoruber* щам 7 на AZCL-субстрати.**

**12. Гел-пермеационна хроматография**



Продуктите от разграждането на ПКЛ с Mw 14,000 в различни етапи на процеса на разграждане бяха анализирани чрез Гел пермеационен хроматографски (GPC) анализ. Анализите бяха проведени при 45°C с елуационна скорост 1.0 мл/мин.

### **13. Пречистване на ензима**

### **14. Характеризиране на свойствата на пречистената липаза**

**14.1. рН оптимум** – беше определен в интервала от 6 до 9.

**14.2. Температурен оптимум** – беше определен в интервала от 45 до 65°C.

**14.3. Термостабилност** - термостабилността се определяше чрез предварително инкубиране на липазата за различно време в при 60°C в отсъствие или присъствие на 5 mM CaCl<sub>2</sub> и остатъчната активност се определяше при 55°C.

### **14.4. Влияние на някои метални йони и инхибитори върху ензимната активност.**

Ефектът на металните йони, EDTA, повърхностно активни вещества и инхибитори върху ензимната активност беше изследван чрез инкубиране на пробите в продължение на 30 минути при стайна температура с избраните химикали (5 mM): ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, KCl, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, NaCl, CaCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, HgCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, натриев додецилсулфат (SDS), Tween 20, динатриева сол на етилендиамин тетраоцетна киселина (EDTA), фенилметилсулфонилфлуорид (PMSF), дитиотреитол (DTT), Na-лаурил сулфат (NaLS) и N-бромсукцинимид (NBS). Остатъчната липазна активност се определяше след анализ при оптимални условия срещу контрола, която не съдържаше добавени химикали.

### **1.16. Определяне на максималната скорост на ензимната реакция (V<sub>max</sub>)**

## Резултати и обсъждане

### 1. Разграждане на пластмаси от термофилни микроорганизми

#### 1.1. Култивиране на щамове от наличната в лабораторията колекция от термофили с използването на различни пластмаси като въглероден източник

Наличните в колекцията щамове първоначално бяха групирани въз основа на тяхната филогенетична близост в единадесет групи (Табл.1).

Табл. 1. Термофилни щамове от колекцията на лабораторията, изследвани за растеж и естеразна активност минимална среда с пластмаса като единствен въглероден източник

Група	Вид, брой щамове	Контрола		ПС		ПП		ПКЛ		ПВА	
		ОД	Е/мл	ОД	Е/мл	ОД	Е/мл	ОД	Е/мл	ОД	Е/мл
1	<i>Bacillus licheniformis</i> – 5	0.4	0	0.6	208.3	0.4	291.6	0.4	129	0.5	137.5
2	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> – 5	0.11	0	0.16	250	0.6	208	0.39	104.2	0.3	83.3
3	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> - 2	0.19	0	0.6	375	0.29	125	0.36	208	0.4	208
4	<i>Geobacillus</i> sp. – 3	0.22	0	0.7	246	0.21	83.3	0.33	166	0.4	125
5	<i>Brevibacillus thermoruber</i> – 22	0.16	0	0.14	0	0.11	0	0.3	125	0.1	0
6	<i>Anoxybacillus flavithermus</i> – 19	0.23	0	0.22	0	0.09	0	0.2	0	0.3	87.5
7	<i>Anoxybacillus gonensis</i> – 14	0.11	0	0.01	125	0.45	158.3	0.1	0	0.1	0
8	<i>Aeribacillus pallidus</i> – 6	0.22	0	0.21	0	0.11	0	0.11	0	0.12	41.7
9	<i>Desulfurococcus</i> - 2	0.26	0	0.23	0	0.24	0	0.09	0	0.09	0
10	<i>Hydrogenobacter</i> - 1	0.10	0	0.09	0	0.05	0	0.31	166	0.13	175
11	<i>Thermus</i> - 1	0.11	0	0.11	0	0.07	0	0.26	83.3	0.27	125

Ензимна активност беше регистрирана за всеки вид пластмаса като при полистирена (ПС) тя достигаше до 375 Е/мл, при полипропилена (ПП) – до 291.6, при поликапролактона (ПКЛ) – 208, при поливинил алкохола (ПВА) – 208. Най-високи активности бяха наблюдавани в трите групи щамове, принадлежащи към род *Geobacillus*. Особен интерес предизвика високата активност на ензима при групи 2 и 3, принадлежащи към вида *Geobacillus thermodenitrificans* и *Geobacillus stearothermophilus* при субстрат бионеразградимите пластмаси ПС и ПП.

Образуването на биофилм, който допринася за тесен контакт между субстрата и синтезиращият естераза микроорганизъм е важно условие за разграждането на бавно усвояващи се субстрати, каквито са пластмасите. Сред синтезиращите естерази

термофилни щамове от колекцията на лабораторията не беше наблюдавана добра филмообразуваща способност. Разрушаването на пластмасовата повърхност при тях се осъществяваше от случайните срещи със свободно дифундиращите в културалната течност естеразни молекули, което определяше и бавната скорост на разграждане въпреки регистрираните високи ензимни активности. Ето защо предположихме възможност за изолиране на по-ефективни деградатори от естествени местообитания, съдържащи пластмасови отпадъци.

### **1.2. Характеристика на местата за пробовзимане**

За пробовзимане бяха избрани пет извора в Югозападна България с температура на водата от 46 до 72°C (Табл. 2). Този температурен интервал съвпада с областта за растеж на облигатните термофилни бацили, растящи между 50 и 70°C с оптимална температура 55-65°C (Bonch-Osmolovskaya and Atomi, 2015). Термофилните микроорганизми са най-предпочитани за биотехнологично използване заради по-бързия им растеж, по-лесното им култивиране и разработените системи за експресия на ензимни гени. Измереното рН на водите беше неутрално-слабо алкално.

Табл. 2. Горещи извори в България, от които са взети проби

<b>Проба №</b>	<b>Горещи извори за пробонабиране</b>	<b>Т°C</b>	<b>рН</b>
1	Рупи	72	8.8
2	Левуново	71	8.0
3	Марикостиново	57	8.3
4	Симитли	46	7.1
5	Долно Осеново	55	7.2

### **1.3. Определяне на растежа и естеразната активност в термофилните съобщества от различните извори**

Микроорганизмите, съдържащи се в пробите бяха набогатени чрез 120 ч. култивиране в 20 мл минимална среда със съответната пластмаса като на всеки 24 ч. бяха измервани растежа ( $OD_{660nm}$ ) и естеразната активност. При трудно разградимите пластмаси (ПП и ПС) наблюдаваната  $OD_{660}$  не се различаваше съществено от тази на контролата (до два пъти), свързано с бавното освобождаване на разградни продукти. При

биоразградимите ПКЛ и ПВА ОД<sub>660</sub> превишаваше тази на контролите до 6 пъти (проба от Марикостиново, растяща на ПКЛ) и 2.5 пъти (проба от Рупите, растяща на ПВА). Допълнително, в някои от пробите с пластмаси се наблюдаваше плътен растеж върху повърхността на пластмасовите частици (проба от Марикостиново, растяща на ПКЛ) или образуване на агрегати (проба от Рупите, растяща на ПВА)(Табл. 3).

Табл. 3. Растеж и естеразна активност на термофилни микробни съобщества (72-ри час на култивиране)

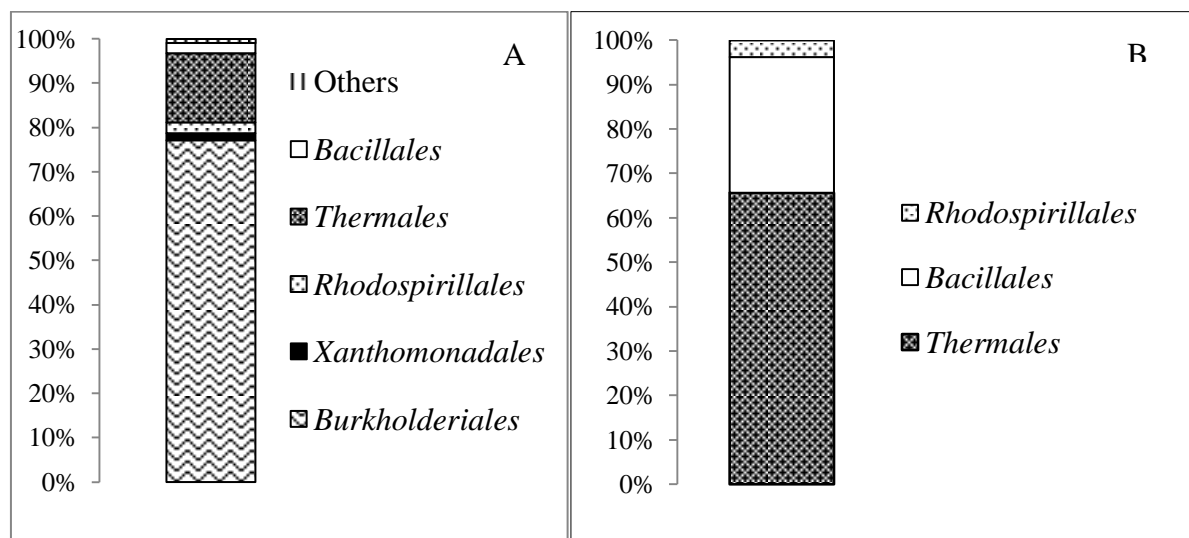
Проба	Контрола		ПП			ПС			ПКЛ			ПВА		
	ОД	Е/мл	ОД	Е/мл	Брой изолати	ОД	Е/мл	Брой изолати	ОД	Е/мл	Брой изолати	ОД	Е/мл	Брой изолати
1	0.12	0	0.13	0		0.18	0		0.13	0		0.30	54.83	1
2	0.09	0	0.22	0		0.13	0		0.32	102.1	2	0.18	0	1
3	0.11	0	0.15	46.3	1	0.22	69.75	1	0.70	375	12	0.15	0	
4	0.08	0	0.23	0		0.12	0		0.15	0		0.16	0	
5	0.10	0	0.12	0		0.15	0		0.12	0		0.19	0	

Групата на естеразите и особено подгрупата на липазите са докладвани като основни ензими, участващи в разграждането на редица пластмаси, в които основната връзка в молекулата е естерната (Pathak, 2017; Yu et al., 2009; Singh et al., 2014). Определянето на естеразната активност на пробите беше използвано за характеризиране на наличния в културалните течности ензим. Естеразна активност беше регистрирана при една от пробите за всеки вид пластмаса, с изключение на ПКЛ, при който беше отчетена естеразна активност в две от пробите. Пробата от Марикостиново беше активна в разграждането на ПП, ПС и ПКЛ. Най-висока естеразна активност беше установена в пробата от Марикостиново на ПКЛ, което определи по-нататъшния ни интерес към тази проба.

#### **1.4. Филогенетично разнообразие в съобществото от Марикостиново, култивирано без пластмаса и в присъствие на ПКЛ и ПС**

Метагеномният анализ показва, че съставът на съобществото в контролата, несъдържаща пластмаса (МК-К) (Табл. 4 и Фигура 1, А) се характеризира с голямо

разнообразие (11 филогенетични групи, 5 разреда) и силно доминиране на тип *Proteobacteria* (81.2%), предимно *Betaproteobacteria* (77.2%). Наличието на протеобактерии е универсално за проби от околната среда. Други представени типове са *Deinococcus-Thermus* (15.5%) и *Firmicutes* (2.3%). Съставът на съобществото в присъствието на ПКЛ (МК-ПКЛ) (Таблица 4 и Фигура 1, В) е по-ограничен (7 филогенетични групи, 3 разреда). Значителното намаляване на *Proteobacteria* до 3,7%, представена само от вида *Eliaoraea tepidiphila* в МК-ПКЛ водеше до процъфтяване на типовете *Deinococcus-Thermus* (65.6%) и *Firmicutes*, Клас *Bacilli* (30.7%). Увеличаването на *Bacillales* беше повече от 13 пъти, а на *Deinococcus-Thermus* повече от 4 пъти. Доминирането на родове *Meiothermus* (58.1%) и *Brevibacillus* (18.5%) предположи тяхното активно участие в разграждането на ПКЛ. Подобно доминиране на пластмаса-активни таксони е докладвано за някои морски съобщества, изолирани от съдържащи пластмасови остатъци проби (Dussud et al., 2018; Tourouva et al., 2020). За съжаление, сравнение между състава на термофилните съобщества с и без пластмаса не беше възможно поради липсата на такава информация в литературата. 16S рРНК секвенции, идентифицирани в двете съобщества, бяха депозирани в NCBI с BioProject accession number PRJNA766622 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/PRJNA766622>, Accessed on 29 September 2021).



Фиг. 1. Бактериални разреци представени в: А, МК-К; В, МК-ПКЛ

Табл. 4. Таксономични групи идентифицирани в МК-К и МК-ПКЛ

Идентифицирана група	Филогенетична принадлежност	Дял на секвенциите, %	
		МК-К	МК-ПКЛ
<i>Caldimonas</i> sp.	Phylum <i>Proteobacteria</i> , Order <i>Burkholderiales</i>	42.2	-
<i>Tepidimonas ignava</i>	Phylum <i>Proteobacteria</i> , Order <i>Burkholderiales</i>	21.0	-
<i>Meiothermus</i> sp.	Phylum <i>Deinococcus-Thermus</i> , Order <i>Thermales</i>	14.5	58.1
<i>Tepidimonas</i> sp.	Phylum <i>Proteobacteria</i> Order <i>Burkholderiales</i>	13.7	-
<i>Bacillales</i>	Phylum <i>Firmicutes</i> , Order <i>Bacillales</i>	2.3	11.6
<i>Thermomonas</i> sp.	Phylum <i>Proteobacteria</i> , Order <i>Xanthomonadales</i>	1.5	-
<i>Eliaera tepidiphila</i>	Phylum <i>Proteobacteria</i> Order <i>Rhodospirillales</i>	1.1	3.7
<i>Thermaceae</i>	Phylum <i>Deinococcus-Thermus</i> , Order <i>Thermales</i>	1.1	7.5
<i>Roseomonas</i>	Order <i>Rhodospirillales</i> Family <i>Acetobacteraceae</i>	0.9	-
<i>Acetobacteraceae</i>	Class <i>Alphaproteobacteria</i> Order: <i>Rhodospirillales</i>	0.5	-
<i>Burkholderiales</i>	Phylum <i>Proteobacteria</i> Order: <i>Burkholderiales</i>	0.3	-
<i>Brevibacillus</i>	Phylum <i>Firmicutes</i> Order <i>Bacillales</i>	-	18.5
<i>Paenibacillus</i>	Phylum <i>Firmicutes</i> Order <i>Bacillales</i>	-	0.4
<i>Bacillaceae</i>	Phylum <i>Firmicutes</i>	-	0.2

Представеният брой таксономични групи в проба МК-ПС, култивирана в среда с полистирен, беше сходен с този в контролата - 11 в контролата и 10 в пробата с ПС (Табл. 5), което се обяснява с по-малкия селективен натиск на субстрата от присъствието на трудно разградимия ПС. Както и при ПКЛ, относителният дял на различните групи беше различен. Наблюдаваше се значително намаление на дела на *Proteobacteria* от 80.3% до 21.1%, съпроводено с нарастване дела на *Bacillales* от 2.3% до 18.8%, като само род *Brevibacillus* от неидентифициран в контролата (идентифицирани бяха таксони, представени с >0.1% от общо присъстващите секвенции) достигаше 10.4%, което предположи активното участие на представители на този род в разграждането и на този

вид пластмаса. Друга повтаряща се особеност на съобщество МК е значителното увеличение на дела на представителите на род *Meiothermus* и при двата вида пластмаса.

Табл. 5. Характеризиране на биоразнообразието на съобщество от Марикостиново в среда с полистирен (МК-ПС)

Идентифицирана група	Филогенетична принадлежност	Дял на секвенциите, %	
		МК-К	МК-ПС
<i>Caldimonas</i> sp.	Phylum <i>Proteobacteria</i> , Order <i>Burkholderiales</i>	42.2	19.2
<i>Tepidimonas ignava</i>	Phylum <i>Proteobacteria</i> , Order <i>Burkholderiales</i>	21.0	-
<i>Meiothermus</i> sp.	Phylum <i>Deinococcus-Thermus</i> , Order <i>Thermales</i>	14.5	53.6
<i>Tepidimonas</i> sp.	Phylum <i>Proteobacteria</i> Order <i>Burkholderiales</i>	13.7	-
<i>Bacillales</i>	Phylum <i>Firmicutes</i> , Order <i>Bacillales</i>	2.3	7.6
<i>Thermomonas</i> sp.	Phylum <i>Proteobacteria</i> , Order <i>Xanthomonadales</i>	1.5	-
<i>Elioraea tepidiphila</i>	Phylum <i>Proteobacteria</i> Order <i>Rhodospirillales</i>	1.1	1.3
<i>Thermaceae</i>	Phylum <i>Deinococcus-Thermus</i> , Order <i>Thermales</i>	1.1	4.3
<i>Roseomonas</i>	Order <i>Rhodospirillales</i> Family <i>Acetobacteraceae</i>	0.9	1.9
<i>Acetobacteraceae</i>	Class <i>Alphaproteobacteria</i> Order: <i>Rhodospirillales</i>	0.5	0.6
<i>Burkholderiales</i>	Phylum <i>Proteobacteria</i> Order: <i>Burkholderiales</i>	0.3	-
<i>Brevibacillus</i> sp.	Phylum <i>Firmicutes</i> Order <i>Bacillales</i>	-	10.4
<i>Rubroacter</i> sp.	Phylum <i>Actinobacteria</i> , Order <i>Rubroacterales</i>	-	0.9
<i>Paenibacillus</i> sp.	Phylum <i>Firmicutes</i> Order <i>Bacillales</i>	-	0.6

### 1.5. Идентификация на термофилни бактерии, разграждащи различни видове пластмаси

Осемнадесет щама общо бяха изолирани от проби от различните извори, инкубирани с различни видове пластмаси. В резултат на проведената амплификация с PCR праймерите и последващото секвениране със секвенционните праймери бяха идентифицирани нуклеотидните последователности на целите 16S рРНК гени. 16S рРНК

гени на изолатите бяха депозирани в Gene Bank на 29.01.2021 и 15.04.2021 с номера от MW541894 до MW541896 и от MW927322 до MW927332. Секвенциите бяха сравнени с депозираните в банката данни с използването на Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=%20BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=%20BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)).

Осемнадесетте изолата бяха отнесени към осем термофилни вида от три семейства, два типа, *Firmicutes* и *Deinococcus-Thermus* (Табл. 6). Сред изолатите доминираше тип *Firmicutes*, Клас *Bacilli*, Разред *Bacillales* със 17 изолата - девет щама от *Brevibacillus thermoruber* (*Paenibacillaceae*), два щама от *Aneurinibacillus thermoaerophilus* (*Paenibacillaceae*), два щама от *Geobacillus thermodenitrificans* (*Bacillaceae*) и един щам от *Meiothermus cateniformans* (*Thermaceae*). Доминиращият брой бацили е в съответствие с общоприетото схващане, че те са основни микроорганизми в процесите на разграждане и биотрансформации (Mahdi et al., 2016). Най-многобройни бяха представителите на *Brevibacillus thermoruber* (*Paenibacillaceae*), което предположи активното участие на тези микроорганизми в разграждането на пластмасите. Тип *Deinococcus-Thermus* е представен само с един изолат, отнесен към вида *Meiothermus cateniformans*. Естеразна активност при растеж в среда с ПКЛ беше регистрирана в две от пробите, от Левуново (54.83 Е/мл) и от Марикостиново (375 Е/мл) (Табл. 3). От 14-те щама, изолирани от тези две проби дванадесет видимо различни колонии произхождаха от съобществото от Марикостиново (МК-ПКЛ). Те бяха пречистени чрез трикратно разсяване на богата среда и идентифицирани.



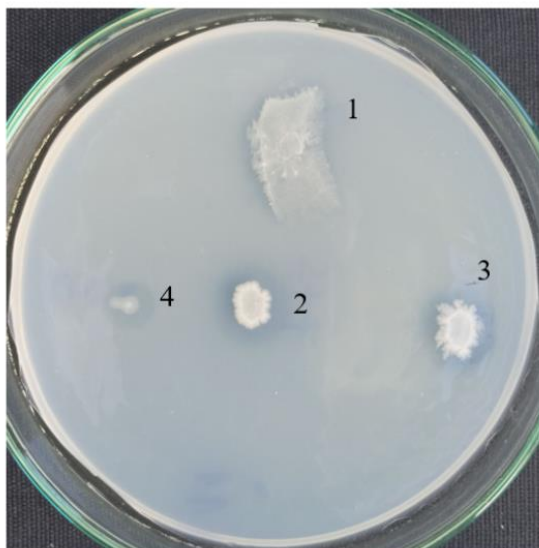
Табл. 6. Филогенетична принадлежност на шамовете, изолирани от различните проби в присъствие на някоя от четирите вида пластмаси

Щам №	Вид пластмаса в средата	Секвенцио нен номер	Най-близкородствени организми, %	Тип, Клас, Семейство	Разред;
1	ПВА	MW541891	<i>Anoxybacillus kamchatkensis</i> G10, 99.73	<i>Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae</i>	
2	ПВА	MW541892	<i>Geobacillus vulcani</i> strain 2C, 99.80	<i>Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae</i>	
3	ПС	MW541893	<i>Fictibacillus gelatini</i> strain LMG 21880, 99.86	<i>Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae</i>	
4	ПКЛ	MW541894	<i>Brevibacillus thermoruber</i> strain B4M, 99.86	<i>Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Paenibacillaceae</i>	
5	ПКЛ	MW541895	<i>Brevibacillus thermoruber</i> strain B4M, 99.73	<i>Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Paenibacillaceae</i>	
6	ПКЛ	MW541896	<i>Brevibacillus thermoruber</i> strain BT2, 99.46	<i>Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Paenibacillaceae</i>	
7	ПП	MW541897	<i>Brevibacillus borstelensis</i> strain Gp-1, 100	<i>Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Paenibacillaceae</i>	
8	ПКЛ	MW927322	<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> , 99.12	<i>Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Paenibacillaceae</i>	
9	ПКЛ	MW927323	<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> , 99	<i>Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Paenibacillaceae</i>	
10	ПКЛ	MW927324	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> , 99.42	<i>Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae</i>	
11	ПКЛ	MW927325	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> , 99.89	<i>Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae</i>	
12	ПКЛ	MW927326	<i>Brevibacillus thermoruber</i> , 99.36	<i>Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Paenibacillaceae</i>	
13	ПКЛ	MW927327	<i>Brevibacillus thermoruber</i> , 99.80	<i>Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Paenibacillaceae</i>	
14	ПКЛ	MW927328	<i>Brevibacillus thermoruber</i> , 99.84	<i>Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Paenibacillaceae</i>	
15	ПКЛ	MW927329	<i>Brevibacillus thermoruber</i> , 99.32	<i>Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Paenibacillaceae</i>	
16	ПКЛ	MW927330	<i>Brevibacillus thermoruber</i> , 99.71	<i>Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Paenibacillaceae</i>	
17	ПКЛ	MW927331	<i>Brevibacillus thermoruber</i> , 99.77	<i>Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Paenibacillaceae;</i>	
18	ПКЛ	MW927332	<i>Meiothermus cateniformans</i> , 99.14	<i>Deinococcus-Thermus; Deinococci; Thermales; Thermaceae</i>	

### 1.6. Разграждащи ПКЛ термофилни щамове, изолирани от съобщество Марикостиново

Високият брой на изолатите и най-високата регистрирана естеразна активност на пробата МК-ПКЛ определиха по-нататъшния ни интерес към характеризиране на тези щамове и процеса на биоразграждане от тях. Те бяха отнесени към четири вида: *Aneurinibacillus thermoaerophilus*, *Geobacillus thermodenitrificans*, *Brevibacillus thermoruber* и *Meiothermus cateniformans*. Най-висока ензимна синтеза се наблюдаваше при съобществото, 375 Е/мл. Сред чистите щамове най-висока естеразна активност от 290 Е/мл беше измерена при *Brevibacillus thermoruber* щам 7 (Табл. 7). Сравнително висока активност беше отчетена и за *Aneurinibacillus thermoaerophilus* щам 2 (115 Е/мл) и *Meiothermus cateniformans* щам 12 (42 Е/мл). Съвместното култивиране на щам 2 и щам 7 доведе до по-висока активност, докато естеразната активност при култивирането на щам 7 и щам 12 беше по-ниска и от тази на самостоятелно култивирания щам 7, поради което щам 12 не беше използван за по-нататъшни експерименти.

Чистите щамове, изолирани от МК, бяха тествани за образуване на ясни зони около колониите върху агарова минимална среда с ПКЛ ( $M_w$  14,000) като единствен въглероден източник (Фиг. 2). Добър растеж и ореоли бяха наблюдавани при *B. thermoruber* щам 7, *A. thermoaerophilus* щам 2 и *M. cateniformans* щам 12. Тези резултати са в съответствие с появата на забележими фракции от *Brevibacillus* и *Meiothermus*, регистрирани чрез метагеномния анализ.



Фиг. 2. Ясни ореоли от ПКЛ разграждащи бактерии изолирани от Марикостиново. 1, МК-ПКЛ; 2, *Brevibacillus thermoruber* щам 7; 3, *Aneurinibacillus thermoaerophilus* щам 2; 4, *Meiothermus cateniformans* щам 12

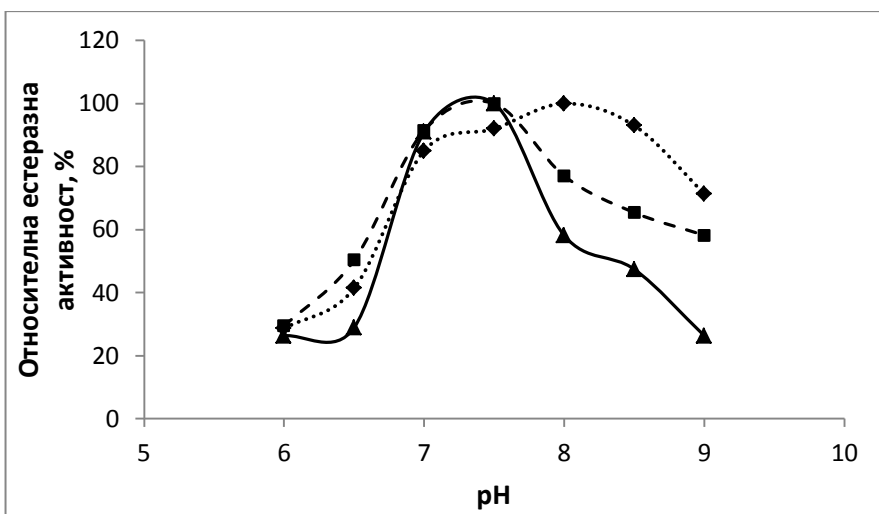
Табл. 7. Растеж и естеразна активност на чистите щамове и комбинацията им с щам 7 след 48 ч. култивиране в среда с ПКЛ

Щам №	Щам, номер на 16S рРНК ген	Чист щам		Комбинация на чистия щам с щам 7	
		OD <sub>660</sub> на щама	Естеразна активност (Е/мл)	OD <sub>660</sub>	Естеразна активност (Е/мл)
1	<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> , MW927322	0.08	0	0.22	97
2	<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> , MW927323	0.10	115	0.19	325
3	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> , MW927324	0.13	65	0.16	62
4	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> , MW927325	0.14	63	0.15	0
5	<i>Brevibacillus thermoruber</i> , MW927326	0.16	32	0.17	62
6	<i>Brevibacillus thermoruber</i> , MW927327	0.16	20	0.25	32
7	<i>Brevibacillus thermoruber</i> , MW541894	0.2	290	-	-
8	<i>Brevibacillus thermoruber</i> , MW541895	0.14	0	0.30	32
9	<i>Brevibacillus thermoruber</i> , MW927328	0.14	42	0.30	135
10	<i>Brevibacillus thermoruber</i> , MW927329	0.11	25	0.11	50
11	<i>Brevibacillus thermoruber</i> , MW927330	0.27	20	0.11	27
12	<i>Meiothermus cateniformans</i> , MW927331	0.2	42	0.10	70
	Микробно съобщество от Марикостиново, PRJNA766622	0.2	375	-	-

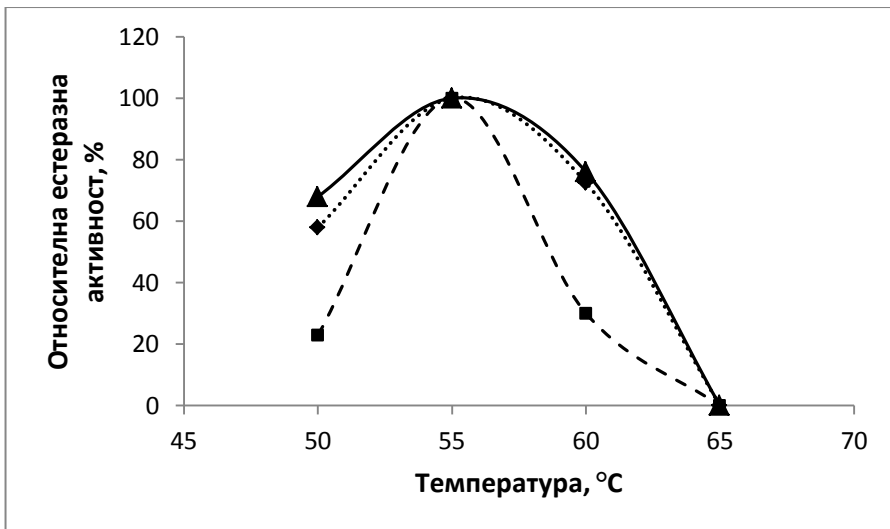
Съобщените досега термофилни ПКЛ разграждащи бактерии принадлежат към род *Streptomyces*. Те са били активни при 40-50°C и са изолирани от мезофилни ниши. *Streptomyces thermonitrificans* PDS-1 е изолиран от компост на рибопреработвателната индустрия (Nakasaki et al., 2006), а *Streptomyces thermoviolaceus* subsp. *thermoviolaceus* 76T-2 е изолиран от почва в Тайван (Chua et al., 2013). В нашите експерименти щам 7, който показва най-висока активност, беше изолиран от горещ извор МК, типична за термофилите екологична ниша. Той беше идентифициран като принадлежащ към вида *Brevibacillus thermoruber* и беше определен като първичен разграждащ микроорганизъм. Той представлява не само първият съобщен термофилен бацил, способен да разгражда ПКЛ, но дори и в мезофилната група не са съобщени ПКЛ разграждащи бацили. Родът *Brevibacillus* е известен като обект на голям биотехнологичен интерес (Panda et al., 2014), но досега е съобщена само активността му към полиетилен с ниска плътност (LDPE).

### **1.7. Оптимизиране на физико-химичните параметри за разграждане на ПКЛ**

В процеса на оптимизиране на рН за разграждане беше установена най-висока естеразна активност на МК-ПКЛ и *B. thermoruber* щам 7 при рН 7.5, докато за култивирането на ко-културата от щам 7 и щам 2 беше при рН 8.0 (Фиг. 3). Този резултат съответства на леко алкалното рН на изворната вода. Ензимната активност се повишаваше с температурата, достигайки максимум при 55°C за всички варианти (Фиг. 4), която е близка до температурата на топене на ПКЛ (55-60°C), при която аморфните области стават меки и гъвкави. Установената оптимална температура превъзхожда описаните в литературата два термофилни продуцента, които се отнасят към *Streptomyces* и са активни при температури 40-50°C (Nakasaki et al., 2006; Chua et al., 2013). Повишаването на температурата над 55°C водеше до топене на пластмасата, особено добре демонстрирана при 65°C, където не беше регистрирана активност.

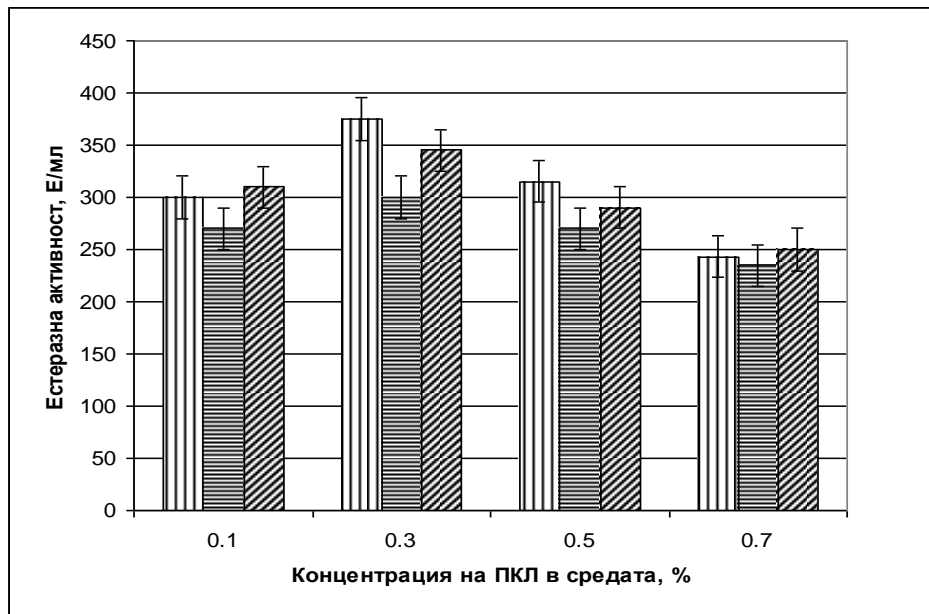


Фиг. 3. pH оптимум на разграждане при температура 55°C. --■--, МК-ПКЛ; —▲—, щам 7; ...◆..., щамове 7+2



Фиг. 4. Температурен оптимум на разграждане при pH 7.5. --■--, МК-ПКЛ; —▲—, щам 7; ...◆..., щамове 7+2

Влиянието на концентрацията на субстрата в средата е представено на Фиг. 5. Най-висока ензимна активност беше измерена при концентрация на ПКЛ 0.3%, 375 Е/мл за МК-ПКЛ, 290 Е/мл за щам 7 и 325 Е/мл за ко-културата на двата чисти щам.



Фиг. 5. Естеразна активност (48-и ч.) при различни концентрации на ПКЛ в средата: ||||, МК-ПКЛ; ▨, *B. thermoruber* щам 7; ▩, ко-култура на *B. thermoruber* щам 7 и *A. thermoaerophilus* щам 2

### 1.8. Въглехидрат разграждаща активност на *B. thermoruber* щам 7 с използването на AZCL-субстрати

При изследване способността на щама да разгражда полизахариди беше установено, че той разграждаше два от изследваните общо 10 AZCL-субстрати: арабинан и амилоза, което наред с неговата способност да хидролизира ПКЛ и мазнини прави щама много перспективен за биотехнологична експлоатация.

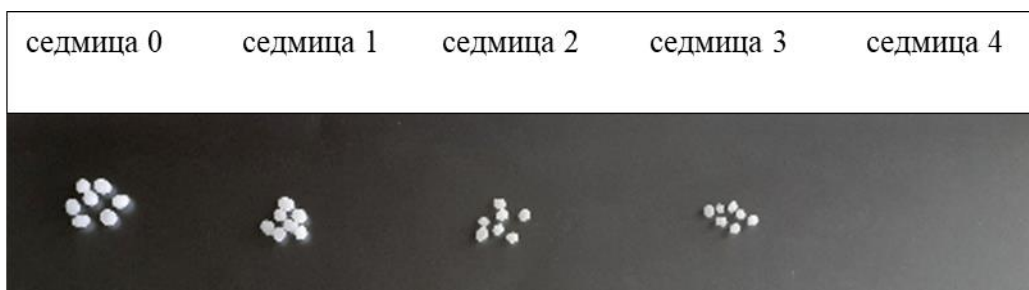
### 1.9. Характеристика на процеса на биоразграждане на ПКЛ

Процесът на биоразграждане на ПКЛ от съобщество МК, щам 7 и ко-култура от щам 7 и щам 2 беше проследена за 4 седмици в течна среда с 0.3% ПКЛ (Mw 80,000) при 55°C, рН 7.5, обороти на клатячката 80 rpm (Табл. 8).

Табл.8. Ефективност на разграждането на ПКЛ от *B. thermoruber* щам 7, and *B. thermoruber* щам 7 + *A. thermoaerophilus* щам 2

Микроорганизъм	Седмица	Крайно тегло	Понижаване на теглото за 7 дни (мг)	Скорост на разграждане на ПКЛ (мг/ден)	Понижаване на теглото за 7 дни (%)	Съдържание на белтък (мг/мл)			Активност (Е/мл)
						Белтък в свободните клетки (мг)	Белтък в биофилма (мг)	Общ белтък (мг)	
Контрола	4	150 ± 9	0	0	0	0	-	0	0
Съобщество	1	88.2	61.8	8.83	41.2	0.23	1.31	1.54	375
	2	48.8	39.4	5.63	26.3	0.45	1.56	2.01	375
	3	20.1	28.7	4.1	19.1	0.63	1.39	2.02	333.8
	4	0	20.1	2.87	13.4	0.17	0.84	1.01	291.6
<i>B.thermoruber</i> щам 7	1	134.7	15.3	2.18	10.2	0.75	0.05	0.80	290
	2	115.2	19.5	2.78	13	0.78	0.15	0.93	290
	3	84.2	31.0	4.42	20.6	0.84	0.19	1.03	258
	4	54.5	29.7	4.24	19.8	0.11	0.14	0.25	125
<i>B.thermoruber</i> щам 7 + <i>A. Thermoaerophilus</i> щам 2	1	125	25	3.57	16.7	0.82	0.13	0.95	325
	2	96.8	28.2	4.02	18.8	1.06	0.19	1.25	308
	3	67.6	29.2	4.17	19.5	1.18	0.19	1.37	280
	4	37.7	29.9	4.27	19.9	0.72	0.17	0.89	248

Пълно разграждане на ПКЛ и липса на следи от перлите се наблюдаваше след четири седмици в присъствието на МК-ПКЛ съобщество (Фиг. 6), докато гравиметричната загуба на тегло беше 63.6% в присъствието на щам 7 самостоятелно и 74.9% при култивирането на щам 7 с щам 2 за същия период от време.



Фиг. 6. Промяна във външния вид на перлите, инкубирани в присъствие на МК-ПКЛ съобщество

Постоянното тегло на ПКЛ в контролните колби показва липса на саморазграждане по време на експеримента. Висока скорост на разграждане наблюдавахме в началото на процеса с максимум 8.83 мг/ден при МК, докато при използване на чистите щамове най-високите нива от ~4 мг/ден бяха измерени във втората част на процеса. Гравиметричната загуба на тегло на ПКЛ е 41.2% от МК и 10.2% от щам 7 след седем-дневен процес.

Ко-култивирането на *B. thermoruber* щам 7 и *A. thermoaerophilus* щам 2 в нашия експеримент водеше до само 10% увеличение на разградения полимер в сравнение с щам 7, вероятно в резултат на едновременното действие на ензимите от двата организма, но не като синергичен ефект от разграждането. Доминирането на *Meiothermus* и неговата ниска естеразна активност предполагат активното му участие главно в образуването на биофилм и/или в използването на междинните продукти на разграждането. В края на първата седмица най-висока активност 375 Е/мл беше измерена в културалната течност на МК, при щам 7 тя беше 290 Е/мл и за щам 7 + щам 2 - 325 Е/мл като във времето всички те показаха слаба тенденция за понижаване. Ензимът не беше открит в разрушените с ултразвук клетки, което свидетелства за екстрацелуларното му акумулиране.

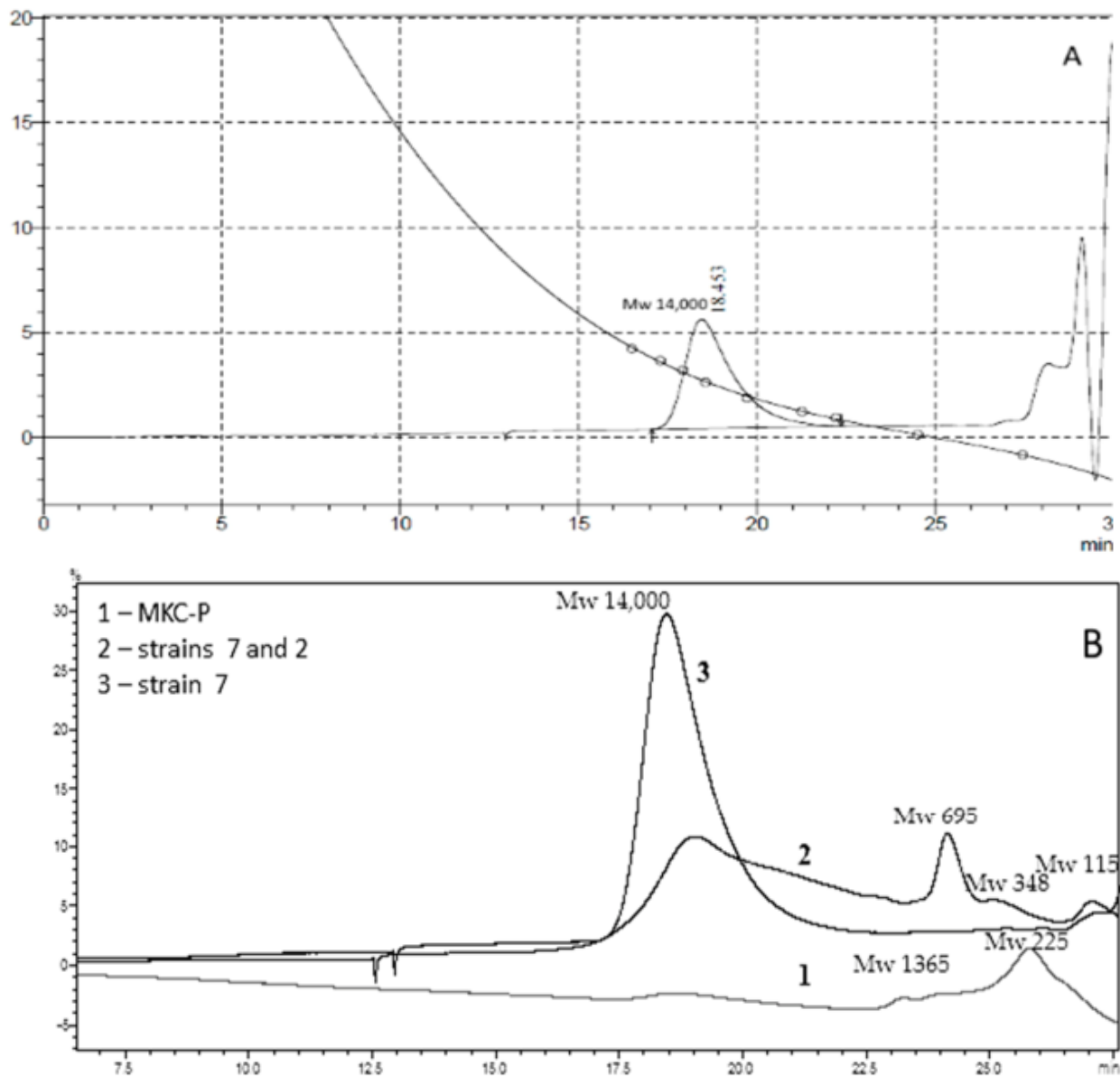
Разликата в ензимната активност, регистрирана в пробите МК-ПКЛ, щам 7 или ко-културата от щам 7 и щам 2 не беше толкова значителна, колкото скоростта на разграждане. По-голямата ефективност на деградационния процес от МК-ПКЛ се обяснява с формирането на биофилм, който поставя микроорганизмите и субстрата в непосредствен контакт и оттук по-ефективно действие на ензима. Концентрацията на клетките определена като белтък в биофилма достигаше 7.3 пъти по-високи нива при МК-ПКЛ, в сравнение с другите две проби. Ниската концентрация на белтък в свързаните с пластмасата клетки от щам 7 и ко-културата му с щам 2 предполага, че тези два щамове не са основните участници във формирането на биофилм от съобществото.

### **1.10. Идентифициране на продуктите от разграждането на поликапролактона**

Резултатите от анализа на продуктите от разграждането на ПКЛ бяха получени с използването на гел-пермеационна хроматография. Характерните пикове в елуационните профили на трите проби бяха много сходни за пробите от 24, 48, 72, 96, 120 и 168 ч. от култивирането. Беше наблюдаван различен профил на елуиране при използване на МК-ПКЛ, щам 7 и ко-култура на щам 7 и щам 2, което беше особено добре демонстрирано на 48-мия час от култивирането (Фиг. 7). Пик, съответстващ на молекулно тегло от 14 000 на



субстрата ПКЛ се появи при елуационен обем 18.4 мл в пробите от щам 7 и щам 7 + щам 2, но с различен дял – 83.7% за щам 7 и 54.9% за ко-културата. Единственият допълнителен пик в супернатантата от щам 7 беше при елуационен обем 27.0 мл, който съответства на мономера  $\epsilon$ -капролактон (14.9%). Регистрирането на мономера в супернатанта от щам 7 предполага, че този микроорганизъм не е в състояние да асимилира  $\epsilon$ -капролактон или асимилацията му е по-бавна от освобождаването му от ПКЛ молекулата. Наличието само на мономера като разграден продукт показва, че ензимът от този щам е екзо-ензим, който хидролизира естерните връзки в краищата на полимерната верига. В смесената култура от щам 7 и щам 2 бяха наблюдавани три други пика с елуационен обем 24.4, 25.1 и 26.9 мл, съответстващи на междинни продукти с молекулно тегло на хексамер (22.8%), тример (3.7%) и мономер (4.2%). Появата на различни междинни продукти с ниско молекулно тегло в супернатанта от ко-културата на щам 7 и щам 2 потвърждава предположението, че щам 2 синтезира ензим(и), различен от този на щам 7, който действа във вътрешността на полимерната верига. За разлика от нашите резултати, *Streptomyces thermonitrificans* PDS-1 е докладван като единствено способен да разгражда ПКЛ, но съвместното му култивиране с *Bacillus licheniformis* HA1 е довело до ускорено разграждане и увеличено количество на разградения полимер, тъй като HA1 е способствал за разграждане на междинните продукти (Nakasaki et al., 2006). В супернатантата от съобществото, ПКЛ пик почти липсваше, което показва че МК-ПКЛ е най-ефективен при разграждането на ПКЛ, тъй като в процеса на асимилиране участват различни микроорганизми. Регистрираните пикове с елуационни обеми 23.8 мл и 25.8 мл съответстваха на 12-мер (8.2%) и димер (91.7%), Мономер също не беше регистриран, което предполага наличието на микроорганизми в съобществото, които осъществяват пълната минерализация до  $H_2O$  и  $CO_2$ .



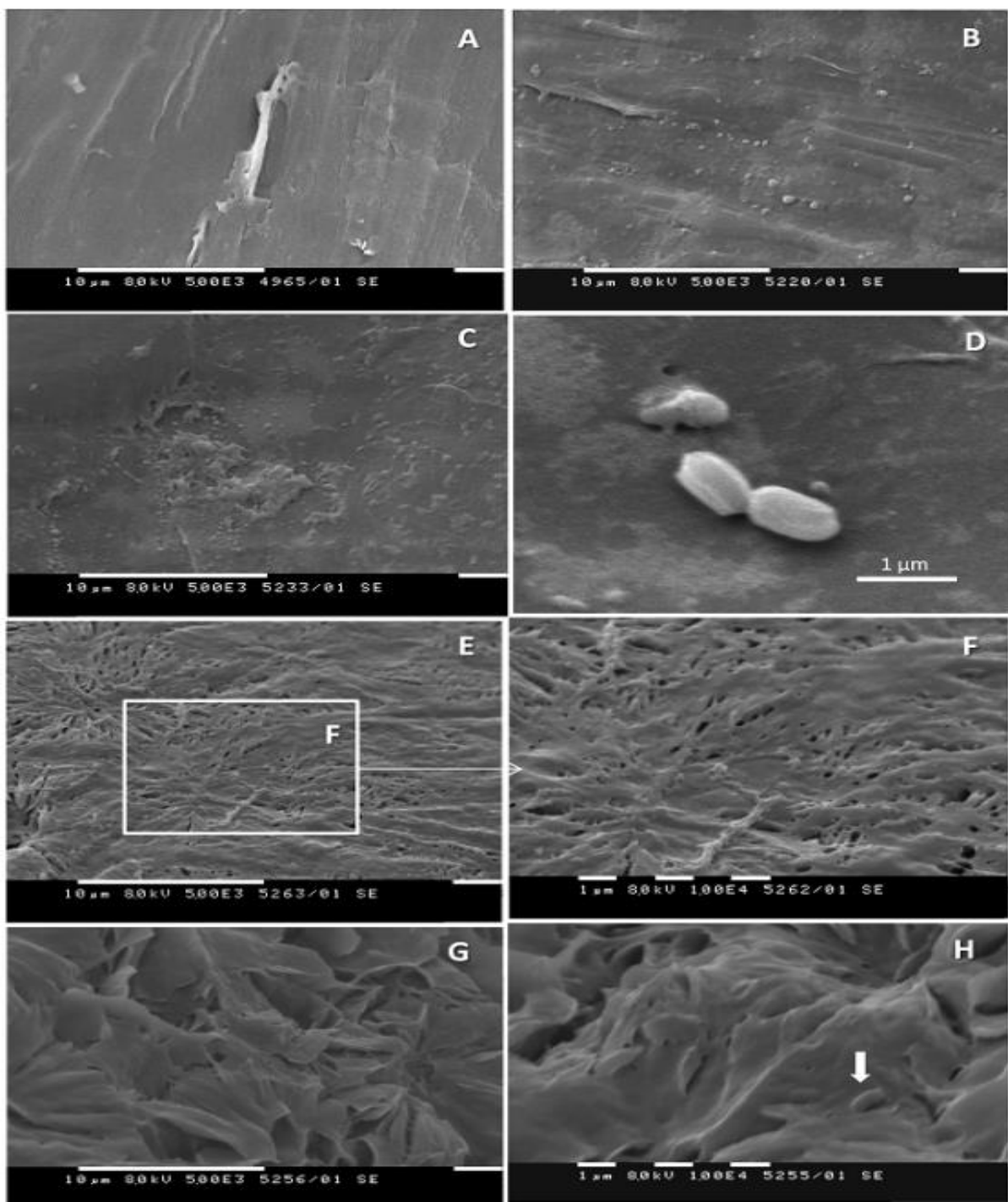
Фиг. 7. Елуационен профил на продуктите от разграждането на ПКЛ на 48 ч. от култивирането. (А), контрола – чист ПКЛ; (Б), 1, МК-ПКЛ; 2, ко-култура на *B. thermoruber* щам 7 и *A. thermoaerophilus* щам 2; 3, *B. thermoruber* щам 7

### 1.11. СЕМ анализ на промените в повърхността на пластмасите

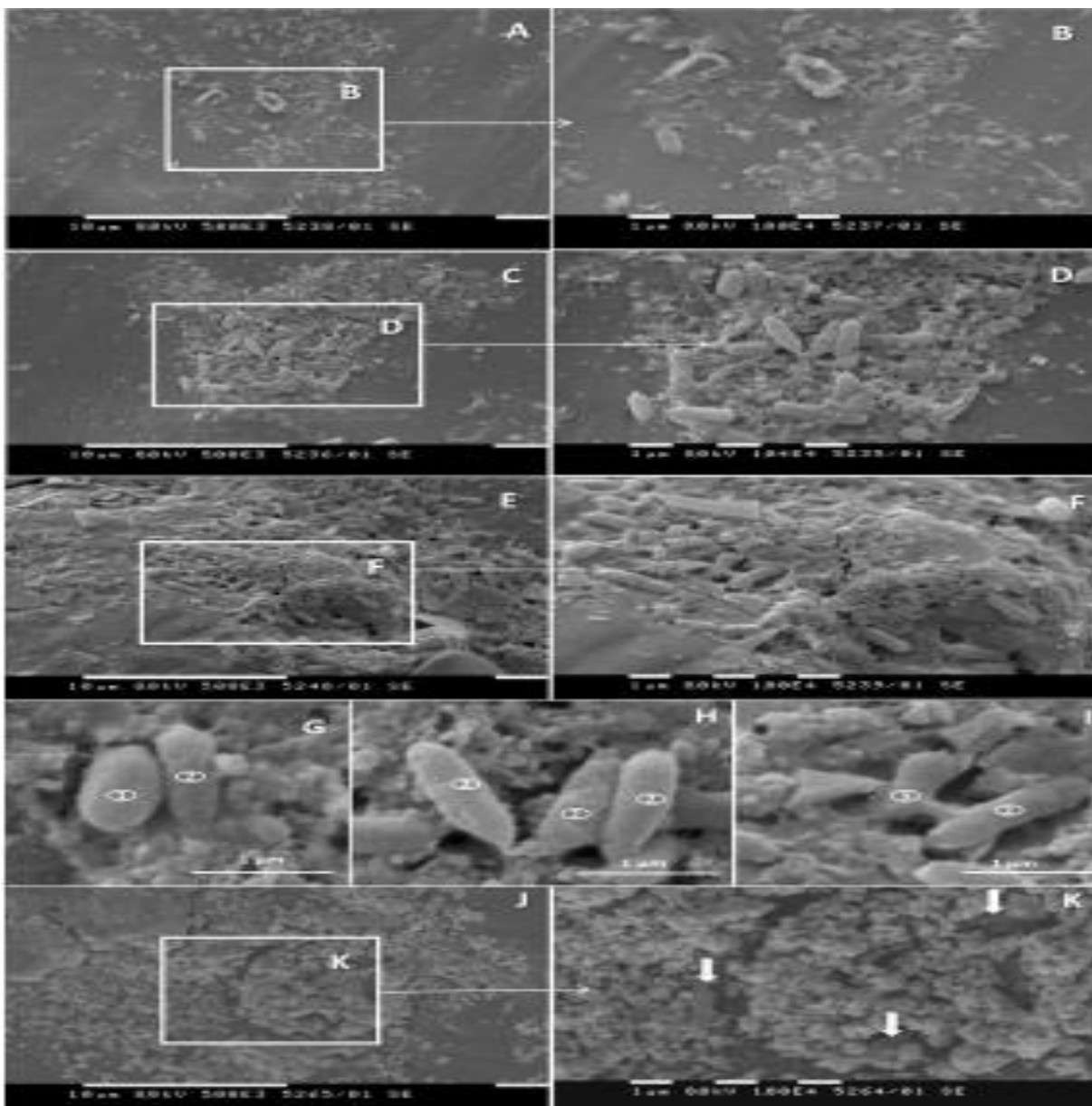
При анализа, проведен със сканираща електронна микроскопия (СЕМ) беше наблюдавано, че повърхността на перлите ПКЛ на контролните проби не са напълно гладки (Фигура 8, А), но видът ѝ не се променяше при 2-седмично инкубиране. Култивирането на *B. thermoruber* щам 7 за 72 часа води до поява на подобни на мехурчета

малки подутини върху повърхността на перлите (Фигура 8, В) и повърхностни деформации (Фигура 8, С и D), които не се различаваха значително от деформациите на контролните перли (Фигура 8, А). Бактериални клетки с размери  $1.1 \times 0.6 \mu\text{m}$  се наблюдаваха рядко върху перлените повърхности (Фигура 8, D). Три-седмичното култивиране в присъствието на щам 7 доведе до значителни промени на ПКЛ повърхност. Характерно беше формирането на по-плитки (Фиг. 8, Е и F) или по-дълбоки (Фиг. 8, G и H) нагъвания. Присъствието на прикрепени клетки беше все още рядко (Фиг. 8, H), което предполага, че промените в повърхността на ПКЛ се дължат предимно на освобождаването на ензими в културалната среда, а не толкова на образуването на биофилм.

СЕМ снимките на ПКЛ повърхност при култивиране на бактериалното съобщество се различаваха значително от тези на единичния щам. На 72-рия час се наблюдаваха струпвания от прикрепени клетки (Фиг. 9, А и B) и развитие на биофилм от микроколонии. Те бяха различни по дължина, ширина и съотношение на дължината към ширината. Първият тип бяха клетки с размер  $1.05 \pm 0.13 \times 0.63 \pm 0.10 \mu\text{m}$ , съотношение дължина/ширина 1.6 (Фигура 9, G) и бяха морфологично подобни на тези на щам 7 (Фиг. 9, D). Те представляваха 25% от всички измерени клетки. Преобладаващият тип клетки (68%) бяха с размери  $1.45 \pm 0.29 \times 0.45 \pm 0.05 \mu\text{m}$ , съотношение дължина/ширина 3.22 (Фиг. 9, G–I). От третия морфологичен тип се наблюдаваха само няколко бактерии и представляваха 7% от измерените клетки. Те имаха крушовидна форма с размери  $1.07 \pm 0.12 \times 0.45 \pm 0.02 \mu\text{m}$ , съотношение дължина/ширина 2.4 (Фиг. 9, I). На третата седмица честотата на значително деформирани участъци не нарастна значително в сравнение със 72-часовия интервал, но се наблюдаваше разрушение на пластмасата в дълбочина като голяма част от бактериите бяха наблюдавани под повърхността на пластмасовите перли. Установяваха се зърнести структури, а под тях се виждаха части от бактериалните клетки (Фиг. 9, J и K). Този зърнест материал вероятно беше съставен от екстрацелуларни полимери, синтезирани от биофилма, с включени в тях неразградени пластмасови фрагменти.



Фиг. 8. Промени в повърхността на ПКЛ перли, култивирани в присъствието на *Brevibacillus thermoruber* щам 7. А, контрола. В - D, ПКЛ перли в присъствието на щама за 72 часа. Деформациите на повърхността на ПКЛ включват издутини, подобни на мехурчета (В и С), случайно наблюдавани единични прикрепени бактерии (D, стрелка). Е - H, култивиране в присъствието на щама за 3 седмици. Повърхността на ПКЛ св характеризира с по-повърхностни (Е, F) или по-дълбоки (G, H) гънки с ниска честота на прикрепени бактерии (H, стрелка).



Фиг. 9. Образуване на биофилм върху повърхността на ПКЛ перли в присъствието на бактериалното съобщество. А - F, 72 час култивиране. Прикрепване на бактериалните клетки (А, В), образуване на микроколонии (С, D) и проникване на бактериите в пластмасата (Е, F). Бактериите от биофилма върху перлите ПКЛ са три морфологични типа. (G, H, I): (1) овални клетки, морфологично подобни на клетките на *B. thermoruber* 7 (5, D); (2) пръчковидни клетки; (3) крушовидни клетки. След триседмично култивиране (J, K) преобладаваха зони със зърнест материал и бактериалните клетки бяха под този материал (K, стрелка)

Ефективното разграждане на ПКЛ от съобществото в началото на процеса може да се обясни с наличието на микроорганизъм, който се прикрепва към пластмасовата

повърхност и допринася за образуване на биофилм. Резултатите от СЕМ предполагат, че този биофилм съдържа най-малко три различни щамове бактерии. Една от тях беше морфологично подобна на малките клетки, прилепнали към ПКЛ в пробата, инокулирана с *B. thermoruber* щам 7. Очевидно щам 7 няма добри биофилм-формиращи свойства и присъствието на други щамове в съобществото очевидно увеличава неговите адхезионни способности. Сравнително по-доброто прикрепване на клетките от "морфотип щам 7" на 72-рия час показва, че може да има синергично взаимодействие между щамовете на общността при колонизацията на пластмасовата повърхност.

Бликият контакт между пластмасата и микроорганизмите чрез образуване на биофилм благоприятства процеса на биоразграждане (Ganesh et al., 2020). Наблюдаваното тук забавяне на скоростта на разграждане в по-късните етапи може да се обясни с възпрепятстване на метаболитния поток през натрупания биофилм. Увеличаването на скоростта на разграждане в късен етап в присъствието на чисти щамове потвърждава наблюдението, че щам 7 и щам 2 не образуват добър биофилм и повишеното разграждане е свързано с увеличаването на броя на клетките в културалната течност, продуциращи липаза. Такова предположение се потвърждава и от по-високата концентрация на белтък в супернатантата в тези варианти в сравнение с МК-ПКЛ. В същото време белтъкът в сваления от пластмасата биофилм е няколко пъти по-висок. СЕМ изследванията потвърдиха увреждане на пластмасовата повърхност във всички варианти, но образуването на биофилм само в МК-ПКЛ.

## **2. Липаза от *B. thermoruber* щам 7**

Ефективното разграждане на ПКЛ от щам 7 определи интереса ни към изолирането на ензима, отговорен за биодеградацията.

### **2.1. Пречистване на липазата**

Беше разработена триетапна схема за пречистване на ензима, синтезиран от *B. thermoruber* щам 7 (Таблица 9), като в резултат беше постигнат фактор на пречистване 23.1 пъти и краен добив от 51.4%, което е много добър добив за липофилен ензим.

Табл. 9. Профил на пречистване на липазата от *Brevibacillus thermoruber* щам 7

Етап на пречистване	Обем (мл)	Белтък		Активност		Специфична активност (Е /мг)	Пъти пречистване	Добив, %
		мг	%	Е/мл	%			
Супернатанта	1470	292	100	138181	100	473.2	1	100
Ултраконцентрат	5	110.1	37.7	79040	57.2	717.9	1.52	57.2
ДЕАЕ-Сефароза	28	6.51	2.23	71025	51.4	10910	23.1	51.4

Молекулното тегло на пречистената липаза, определено чрез SDS-PAGE, беше 28 kDa.

### 2.2. Тест за качествено определяне на ензимната активност.

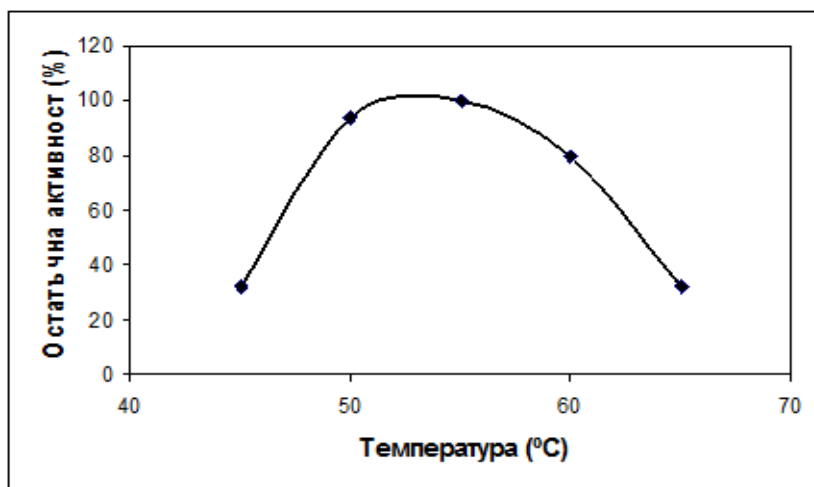
В проведения качествен тест за идентифициране на ензимната активност бяха установени еднакво големи ореоли за предварително изравнените по активности ултраконцентрат и чист ензим, докато в контролата, съдържаща буфер такова просветляване не беше наблюдавано (Фиг. 10).



Фиг. 10. Ясни ореоли се наблюдават в агарова среда, съдържащи 0,1% ПКЛ ( $M_w$  14000), когато 50  $\mu$ L, съдържащи 145 U UC (ултраконцентрат) или E (чист ензим), се инкубират в кладенчетата при 55°C за 24 часа. Като контрола беше използван 0.05 M натриево фосфатен буфер, pH 7.5.

### 2.3. Характеризиране свойствата на пречистения ензим

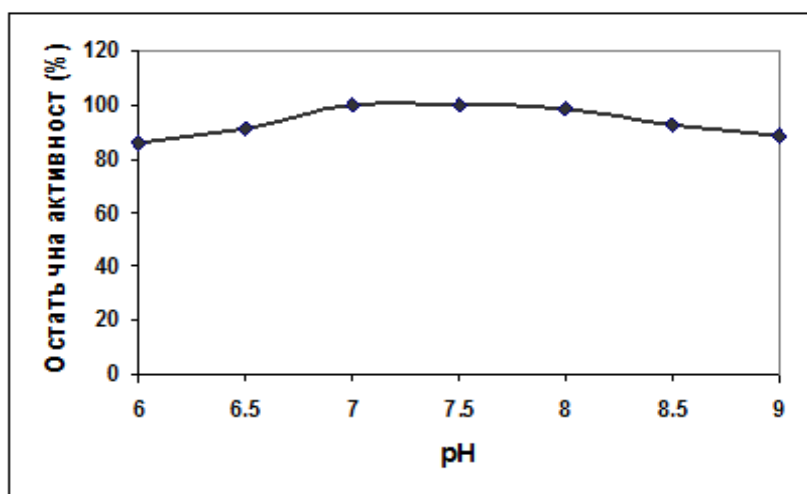
Резултатите от изследването на температурния оптимум за действие на чистата липаза показва най-висока активност при 55°C, температура типична за термофилните ензими (Фиг. 11).



Фиг. 11. Влияние на температурата върху липазната активност на пречистения ензим от щам 7, рН 7.5

Температурният оптимум на този ензим (55°C) съвпада с температурата на топене на ПКЛ 55-60°C (Gajanand et al., 2014), което прави термофилният ензим особено подходящ за ефективното разграждане на ПКЛ. Веригите в аморфните полимерни домени могат да получат достатъчно подвижност за достъп до активните центрове на ензима, когато ензимните хидролитични реакции протичат при температура, близка до температурата на топене (Kawai et al., 2019).

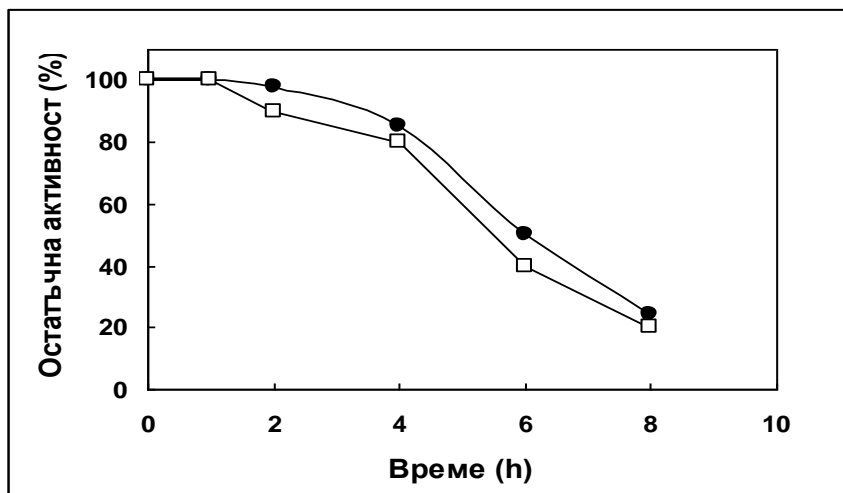
Липазата от щам 7 показва оптимум при рН 7.0-8.0 като беше активен в много широка рН област – регистрираните единици оставаха над 80% при рН от 6.0 до 9.0 (Фиг. 12).



Фиг. 12. рН оптимум на пречистената липаза от щам 7



Проследяването на влиянието на температурата върху стабилността на ензима показва, че той се отнася към най-термостабилните с време на полуживот от 5 часа при 60°C, което се увеличаваше до 6 часа в присъствието на 5 mM Ca<sup>2+</sup> (Фиг. 13).



Фиг. 13. Термостабилност на пречистената липаза след предварителна инкубация при 60°C за различно време (часове). □, чист ензим; •, чист ензим + 5mM CaCl<sub>2</sub>. Остагъчната активност беше определена при 55°C

Повечето от металните йони леко понижаваха ензимната активност, докато Fe<sup>3+</sup> силно я инхибираше (Табл. 10). Единственият метален йон с положителен ефект върху активността беше Ca<sup>2+</sup>. Ензимът беше чувствителен към детергенти, инхибитори и EDTA. Наблюдаваният негативен ефект на хелатния агент EDTA потвърждава, че ензимната активност зависи от присъствието на Ca<sup>2+</sup> в активния център. Инхибирането на ензимната активност от йони на преходни и тежки метали може да е резултат от формирането на комплекси с реактивните групи на ензима, като по този начин го денатурират (Cassia Pereira et al., 2017; Yeboah et al., 2021). Инхибиращия ефект на детергенти като SDS, Tween 20 и DTT вероятно са резултат от понижаване на повърхностното напрежение на водната система и възможна модификация на разпределението на ензима между липидната повърхност и водната фаза (Cassia Pereira et al., 2017, Gargouri et al., 1983). Силното инхибиране от триптофановия инхибитор NBS, тиоловия инхибитор PCMB и сериновия инхибитор PMSF показва важната роля на тези аминокиселини в каталитичния механизъм и възможната модификация на активния център под влияние на инхибиторите. Ефектът на NaLS е свързан със способността му да образува водородни връзки с ензимната повърхност (Wang et al., 2018).

Табл. 10. Влияние на някои метални йони, детергенти и повърхностно-активни вещества върху активността на липазата

Метални йони (5 mM)	Относителна активност (%)	Детергенти, Инхибитори(5mM)	Относителна активност (%)
Контрола	100	Контрола	100
Ca <sup>2+</sup>	106.7	NaLS	4.7
Mg <sup>2+</sup>	93.3	SDS	4.5
Co <sup>2+</sup>	93.3	DTT	3.3
K <sup>+</sup>	89.6	Tween 20	2.9
Na <sup>+</sup>	80.0	NBS	2.8
Cu <sup>2+</sup>	80.0	PMSF	2.5
Mn <sup>2+</sup>	80.0	EDTA disodium salt	0
Hg <sup>2+</sup>	66.7		
Zn <sup>2+</sup>	66.7		
Fe <sup>3+</sup>	33.3		

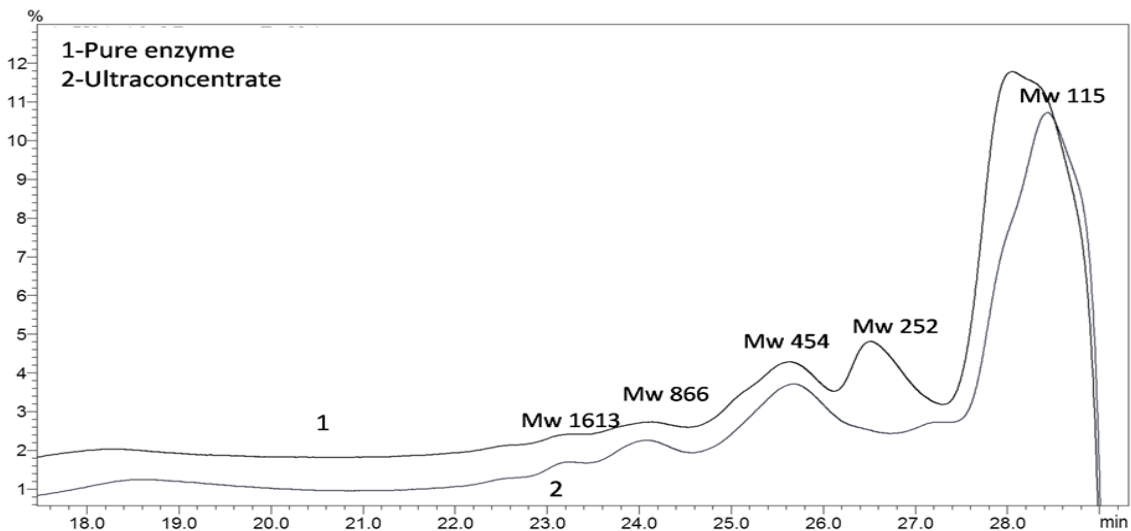
Определянето на субстратната специфичност на ензима с използването като субстрат на пара-нитрофенил палмитат (pNPP), съдържащ 16 въглеродни атома в палмитиновия остатък или пара-нитрофенил бутират (pNPB), съдържащ 4 въглеродни атома във веригата на бутирата ясно демонстрира неговата принадлежност към групата на липазите (EC 3.1.1.3), характеризиращи се с предпочитание към хидролиза на остатъците на дълговерижните мастни киселини, а не към истинските естерази (EC 3.1.1.1). Установената активност на ензима с pNPP беше по-висока в сравнение с pNPB при всички тествани температури (Табл. 11).

Табл. 11. Ензимна активност при използване на р-нитрофенил палмитат и р-нитрофенил бутират като субстрати

Субстрат	30°C	35°C	40°C	45°C	50°C	55°C	60°C
	Е/мл	Е/мл	Е/мл	Е/мл	Е/мл	Е/мл	Е/мл
р-нитрофенил палмитат	87.5	97	170.8	209	267	280	224
р-нитрофенил бутират	37.5	56	79.2	102	116	-	

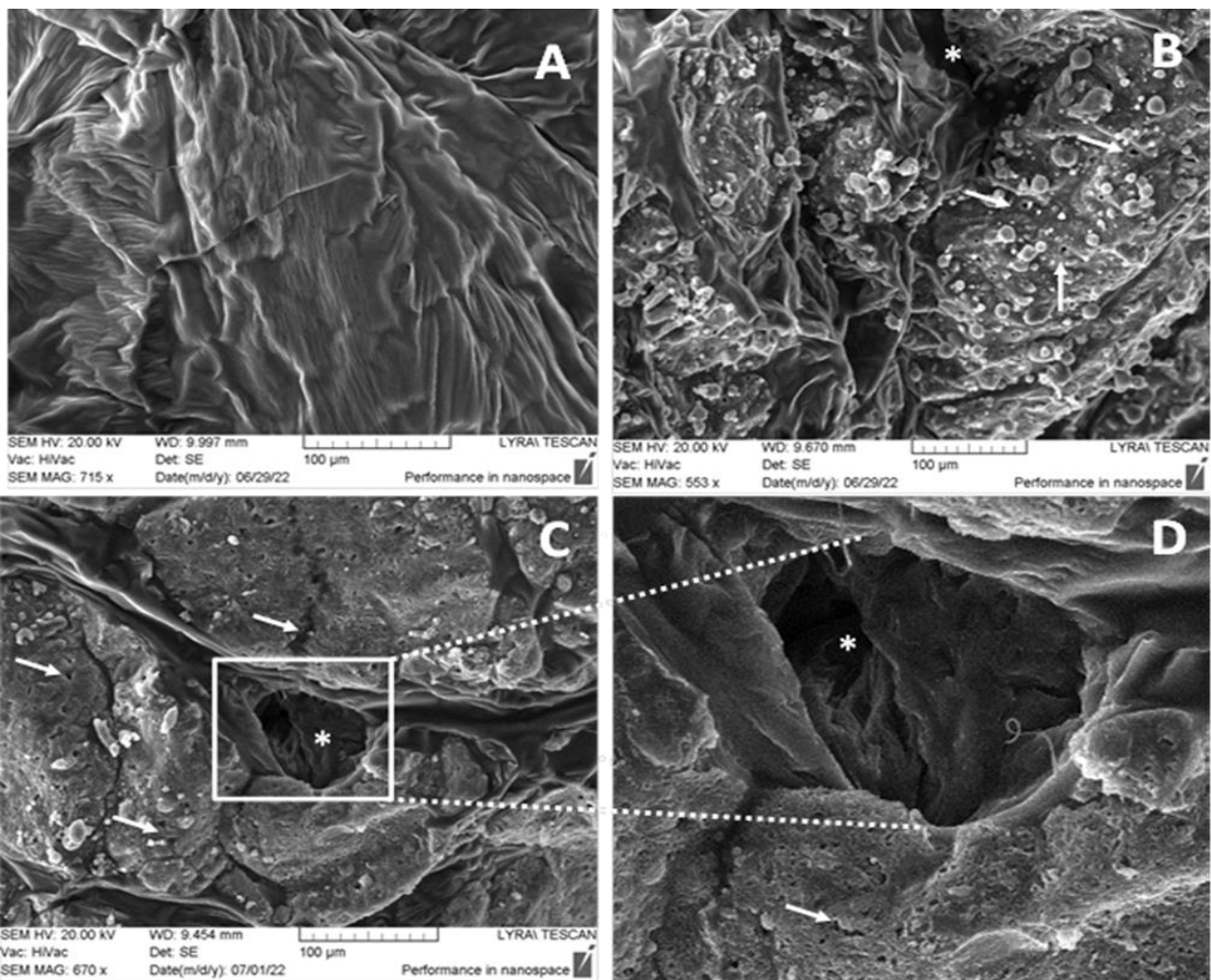
#### 2.4. Продукти от разграждането на ПКЛ от пречистена липаза, изолирана от *B. thermoruber* щам 7

GPC анализът на продуктите от ПКЛ разграждане разкри, че ензимът от щам 7 атакува основната верига на ПКЛ. Сравнението на междинните продукти разкри почти идентичен профил на елуиране, когато ПКЛ се разграждаше от ултраконцентрата или от чистия ензим, което показва, че изолираната липаза е единственият ензим, синтезиран от *B. thermoruber* щам 7 и активен върху ПКЛ (фиг. 14). Обемът на елуиране на основния пик в двете проби беше много сходен, 28.0 мл за пробата от чист ензим и 28.4 мл за ултраконцентрат. Съдържанието на пика беше 65.0% и 66.9%, а изчисленото молекулно тегло от 115 и 125 за чистия ензим и ултраконцентрата, съответно е подобно на молекулното тегло на мономера  $\epsilon$ -капролактон (114). Пик (13.66%) с обем на елуиране от 26.5 мл и Mw от 252, съответстващ на димер, се наблюдава само в пробата с чист ензим. Вторият най-голям пик с обем на елуиране от 25.6 мл и 25.7 мл и с площ на пика от 14.7% и 23.6% и Mw от 454 за чистия ензим и ултраконцентрата, съответно представлява тетрамер. Обемите на елуиране на двата най-малки пика в двете проби съответстват на междинни съединения с молекулно тегло на октамер и 12-мер. Тъй като единственият пик, наблюдаван в супернатантата след 48 часа култивиране на щам 7, беше мономерът, може да се предположи обратна реакция след по-дълго време на действие на ензима.



Фиг. 14. Гел-пермеационен профил на елуиране на междинните продукти от ПКЛ разграждане след една седмица култивиране на *B. thermoruber* щам 7. (1), чист ензим; (2), ултраконцентрат

СЕМ анализът на повърхността на ПКЛ перлите след едноседмичната им инкубация в буферен разтвор на ултраконцентрат и чист ензим (3000 Е/мл) разкриват дълбоки морфологични промени (фиг. 15). Микроскопските изображения на ПКЛ контролата, култивирана в отсъствието на ензим, показват релеф без характерни повърхностни дефекти след инкубационния период (А). Наблюденията на пластмасовата повърхност след инкубиране с ултраконцентрат (В) и чист ензим (С, D) потвърждават разграждане на перлите. Много сходните индикационни ефекти на разграждане с ясно различими в пластмасата дупки (обозначени със звездички) и жлебове (обозначени със стрелки), наблюдавани и при двете проби отново потвърждава, че единственият ПКЛ активен ензим, синтезиран от този щам, е характеризиранията липаза. СЕМ микроснимката след по-голямото увеличение (D) разкри способността за биоразграждане на ензимите дори в долните слоеве на ПКЛ перли. И в двете проби се наблюдаваше материал със зърнеста структура, вероятно съдържащ пластмасови фрагменти в начален етап на ензимното действие.



Фиг. 15. Промени в повърхността на ПКЛ перли, потвърждаващи разградни процеси. (A) контрола; (B) ПКЛ перли, инкубирани в присъствието на ултраконцентрат; (C, D) ПКЛ перли, инкубирани в присъствието на чист ензим

Доколкото ни е известно, изолираната и характеризирана липаза от *B. thermoruber* щам 7 е първият докладван термостабилен ензим, способен да разгражда ПКЛ и сред малкия брой ензими, способни да разградят пластмасите. Оскъдността на информацията за характеристиките на ензима, биохимичните механизми и продукти на разграждане (Ru et al., 2020) възпрепятства сравнението на свойствата на липазата от щам 7 и ензими от други продуценти.

### 3. Разграждане на пластмаси от халофилни бактерии

#### 3.1. Скрининг на халофили от колекцията на лабораторията

Халофилните изолати, съхранявани в лабораторията, бяха групирани в три групи в зависимост от филогенетичната им принадлежност:

Група 1: тип *Firmicutes*, Клас *Bacilli*, родове *Virgibacillus* и *Salinicoccus*

Група 2: тип *Proteobacteria*, Клас *Gamma proteobacteria*, род *Halomonas*

Група 3: тип *Proteobacteria*, Класове *Alphaproteobacteria* и *Gamma proteobacteria*, родове *Nesiotobacter*, *Chromohalobacter*, *Salinivibrio* и *Cobetia*.

Растежът (ОД<sub>660</sub>) и естеразната активност във всяка колба бяха определени след култивиране на всяка група в солева среда с различен вид пластмаса като единствен въглероден източник за две седмици при 30°C, 15% NaCl (Табл. 12).

Табл. 12. Халофилни щамове от колекцията на лабораторията, изследвани за растеж и естеразна активност

Група	Видове в групата, брой щамове	Контрола		ПС		ПП		ПВА		ПКЛ	
		ОД	Е/мл	ОД	Е/мл	ОД	Е/мл	ОД	Е/мл	ОД	Е/мл
1	<i>Virgibacillus salarius</i> – 2 <i>Virgibacillus marismortui</i> – 1 <i>Virgibacillus olivae</i> – 1 <i>Salinicoccus roseus</i> – 1	0.60	0	0.60	0	0.55	0	0.40	0	0.20	0
2	<i>Halomonas venusta</i> – 2 <i>Halomonas variabilis</i> – 3 <i>Halomonas smyrnensis</i> – 1 <i>Halomonas eurhalina</i> – 1	0.70	0	0.60	0	0.90	0	0.60	0	0.32	0
3	<i>Nesiotobacter exalbescens</i> – 1 <i>Chromohalobacter canadensis</i> - 1 <i>Salinivibrio costicola</i> – 1 щам <i>Cobetia marina</i> – 1 щам	0.52	0	0.70	0	0.84	0	0.60	0	1.0	0

От представените в таблицата резултати става ясно, че никой от халофилните щамове от колекцията на лабораторията не е ефективен в разграждането на използваните четири вида пластмаси.

За проучване на разграждащата способност на халофилни микроорганизми бяха събрани проби от луга, вода и кал (Табл. 13) от района на Бургаските и Поморийските солници.

Табл. 13. Халофилни ниши, от които са събрани проби

Проба №	Проба	pH
C1	Луга от Атанасовското езеро	8.0
C2	Вода от Атанасовското езеро	8.7
C3	Кал от Атанасовското езеро	8.2
C4	Вода от началото на Атанасовското езеро	8.1
C5	Кал от Поморийски солници, клетка PS18	8.1
C6	Наситен солен разтвор, клетка PS18	8.0
C7	Пелена над солената вода, клетка PS18	8.0

### 3.3. Определяне на растежа и естеразната активност в халофилните съобщества

Микроорганизмите, съдържащи се в пробите бяха набогатени чрез двуседмично култивиране на два гр кал или два мл вода/луга в 20 мл минимална среда със съответната пластмаса, след което 200 µl бяха прехвърлени в 20 мл свежа среда и култивирани за нови две седмици. Резултатите от измерените оптически плътности и естеразна активност са отразени в Табл. 14. Сравнението на микробния растеж с и без пластмаса показва по-висока оптическа плътност за C1 в присъствието на ПП, ПС и ПКЛ, докато C2 не показва повишаване на този показател при никоя от използваните пластмаси в сравнение с К, въпреки наблюдаваните видими промени в цвета и вида на използваните пластмаси. Очевидно и при халофилите възможността за образуване на биофилм се отразява на точността на използването на този показател за оценка на растежа. Най-високи нива на естеразна активност бяха установени при C2-ПКЛ, последвано от C1-ПКЛ и C2-ПВА. За по-нататъшно характеризиране на способността на халофилите да разграждат пластмаси бяха избрани C1 и C2, растящи в среда с ПКЛ.

Табл. 14. Растеж, естеразна активност и брой изолати за набогатените съобщества от различните проби след 14-дневно култивиране

Проба	Контрола		ПП			ПС			ПКЛ			ПВА		
	ОД <sub>660</sub>	Е/мл	ОД <sub>660</sub>	Е/мл	Брой изолати	ОД <sub>660</sub>	Е/мл	Брой изолати	ОД <sub>660</sub>	Е/мл	Брой изолати	ОД <sub>660</sub>	Е/мл	Брой изолати
C1	0.30	0	0.51	0		0.49	0		0.51	52.8		0.14	29.0	4
C2	0.26	0	0.10	0		0.37	0		0.09	60.3	4	0.11	51.3	2
C3	0.15	0	0.16	17.0	5	0.26	0		0.16	0		0.17	18.4	
C4	0.38	0	0.33	31.0	3	0.25	0		0.27	27.9	3	0.24	0	
C5	0.39	0	0.16	0		0.21	26.3	4	0.45	0		0.43	0	
C6	0.18	0	0.20	0		0.26	0		0.43	0		0.25	0	
C7	0.28	0	0.46	5		0.48	0		0.46	0		0.22	0	

#### **3.4. Филогенетично разнообразие в халофилното съобщество C2, култивирано без пластмаса и в присъствие на ПКЛ**

Чрез метагеномен анализ беше избрано съобществото с най-висока активност C2. на Неговата структура беше разкрита след култивиране в отсъствие (C2-К) и присъствие на ПКЛ (C2-ПКЛ) (Табл. 15).



Табл. 15. Таксономични групи идентифицирани в С2-К и С2-ПКЛ

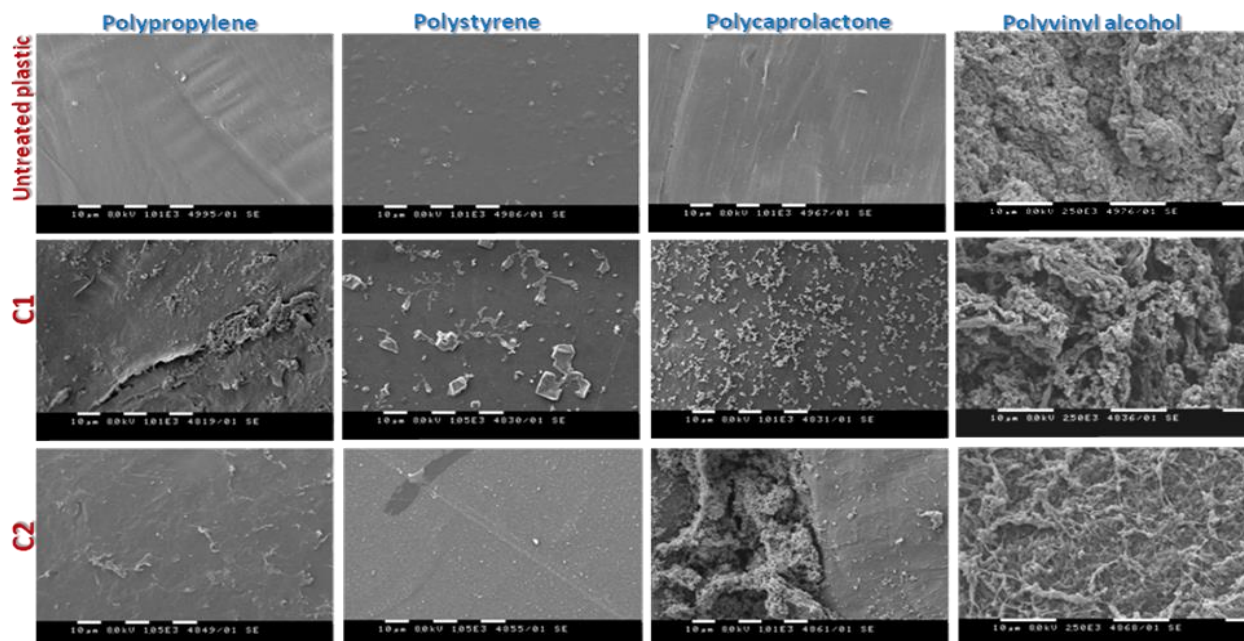
Идентифицирана група	Филогенетична принадлежност	Дял на секвенциите, %	
		С2-К	С2-ПКЛ
<i>Halomonadaceae</i>	<i>Phylum Proteobacteria, Class Gammaproteobacteria</i> <i>Order Oceanospirillales</i>	24.1	49.7
<i>Hyphomonadaceae</i>	<i>Phylum Proteobacteria, Class Alphaproteobacteria</i> <i>Order Caulobacterales</i>	19.5	3.8
<i>Halomonas sp.</i>	<i>Phylum Proteobacteria, Class Gammaproteobacteria</i> <i>Order Oceanospirillales</i>	15.7	40.2
<i>Alcanivorax sp.</i>	<i>Phylum Proteobacteria, Class Gammaproteobacteria</i> <i>Order Oceanospirillales</i>	13.0	0.2
<i>Phyllobacteriaceae</i>	<i>Phylum Proteobacteria, Class Alphaproteobacteria</i> <i>Order Hyphomicrobiales</i>	4.9	0.8
<i>Marteella sp.</i>	<i>Phylum Proteobacteria, Class Alphaproteobacteria</i> <i>Order Hyphomicrobiales</i>	3.1	1.0
<i>Chromohalobacter sp.</i>	<i>Phylum Proteobacteria, Class Gammaproteobacteria</i> <i>Order Oceanospirillales</i>	2.9	2.4
<i>Hyphomicrobiaceae</i>	<i>Phylum Proteobacteria, Class Alphaproteobacteria</i> <i>Order Hyphomicrobiales</i>	2.3	-
<i>Pelagibacterium sp.</i>	<i>Phylum Proteobacteria, Class Alphaproteobacteria</i> <i>Order Hyphomicrobiales</i>	2.3	-
<i>Methylophaga sp.</i>	<i>Phylum Proteobacteria, Class Gammaproteobacteria</i> <i>Order Thiotrichales</i>	1.8	0.6
<i>Marinicauda sp.</i>	<i>Phylum Proteobacteria, Class Alphaproteobacteria</i> <i>Order Caulobacterales</i>	1.6	0.2
<i>Algiphilus aromaticivorans</i>	<i>Phylum Proteobacteria, Class Gammaproteobacteria</i> <i>Order Nevskiales</i>	1.1	-
<i>Proteobacteria</i>	<i>Phylum Proteobacteria</i>	0.9	0.4
<i>Rhizobiales</i>	<i>Phylum Proteobacteria, Class Alphaproteobacteria</i> <i>Order Rhizobiales</i>	0.3	0.1
<i>Rhodobacterales</i>	<i>Phylum Proteobacteria, Class Alphaproteobacteria,</i> <i>Order Rhodobacterales</i>	0.1	-
<i>Rhodobiaceae</i>	<i>Phylum Proteobacteria, Class Alphaproteobacteria</i> <i>Order Hyphomicrobiales</i>	0.1	-

Всички идентифицирани групи и от двете съобщества принадлежаха към *Alpha-* и *Gammaproteobacteria*. В контролата (С2-К) бяха представени седемнадесет филогенетични групи, отнесени към седем разреда, докато при С2-ПКЛ бяха дванадесет групи, отнесени към пет разреда, свидетелстващо за селективния натиск от ПКЛ върху микроорганизмите, неспособни да го усвояват (Табл. 15). Нямаше значителна разлика в представените таксони, особено на по-високите филогенетични

нива. За разлика от С2-К, в С2-ПКЛ бяха представени три разреда от класовете *Alpha- and Gammaproteobacteria*, като разредите *Rhodobacterales* и *Nevskiales* не присъстваха. Относителният дял на двата класа *Alpha- and Gammaproteobacteria* обаче се различаваше значително в двете проби. *Alphaproteobacteria* доминираше в С2-К (61.3%), докато при С2-ПКЛ присъстваше само с 6.9%. В същото време беше наблюдавано значително доминиране на *Gammaproteobacteria* за С2-ПКЛ (93.1%). Под селективния натиск на ПКЛ като единствен въглероден източник делът на семейство *Halomonadaceae*, разред *Oceanospirillales* беше рязко променен – от 24.1% в С2-С до 89.9% предполагайки основната роля на представителите му в процеса на разграждане на ПКЛ и възможната активност на род *Halomonas*, чиито 16S рРНК секвенции се увеличаваха почти три пъти.

### **3.5. СЕМ анализ на промените в повърхността на пластмасите**

СЕМ анализите потвърдиха устойчивостта на бионеразградимите ПП и ПС към действието на бактериалните съобщества, за разлика от активността към биоразградимите пластмаси. Данните от СЕМ бяха в съответствие с резултатите от ензимния анализ, като липсваха видими промени върху повърхностите на ПС и ПКЛ инкубирани със съобщество С1 (бяха наблюдавани само солни кристали) и промените върху повърхността на ПП бяха незначителни (Фиг. 16). Относно ПВА и двете съобщества предизвикваха видими промени на повърхността на пластмасата, докато само С2 предизвикваше видими промени върху ПКЛ. Култивирането на С2 беше съпроводено с формирането на биофилм върху повърхността пластмасата и нейното увреждане.



Фиг. 16. Промени в повърхностния релеф на четирите изследвани типа пластмаси след 14 дневно инкубиране в присъствието на бактериални съобщества C1 и C2.

### 3.6. Разграждащи ПКЛ халофилни щамове, изолирани от съобщество C2

От културалната течност на втория пасаж на проба C2-ПКЛ бяха изолирани 25 щамове. Шест от тях показаха естеразна активност, три при култивиране на ПВА и по един при култивиране на ПКЛ, ПП и ПС (Табл. 16).

Табл. 16. Филогенетична принадлежност и естеразна активност след 14-дневно култивиране

Щам N	Филогенетична принадлежност	Изолиран от проба:	Пластмаса в средата	Растеж, OD <sub>660</sub>	Активност, Е/мл
1	<i>Virgibacillus marismortui</i>	1	ПВА	0.13	7.7
2	<i>Oceanobacillus picturae</i>	2	ПВА	0.35	4.4
3	<i>Virgibacillus salarius</i>	1	ПВА	0.20	13.2
4	<i>Virgibacillus salarius</i>	2	ПКЛ	0.20	2.75
5	<i>Virgibacillus salarius</i>	3	ПП	0.11	2.75
6	<i>Oceanobacillus picturae</i>	5	ПС	0.2 + агрегати	2.75

Подобно на термофилите, и при халофилите всички изолати бяха отнесени към семейство *Bacillaceae*. Те принадлежаха към два вида от рода *Virgibacillus*, *V. salarius*

(3 щам) и *V. marismortui* (1 щам) и рода *Oceanobacillus*, *O. picturae* (2 щам). Степента на подобие на 16S рРНК ген с филогенетичните съседни при всички изолати беше > 97%. Въпреки значителното нарастване на броя секвенции, отнесени към рода *Halomonas*, установено с метагеномен анализ, той не беше изолиран като чист щам, което предполага активното му участие в разграждането на продуктите, получени от действието на първичния деградатор, но и невъзможност за атака на молекулата на ПКЛ.

## Изводи

1. Термофилни съобщества от пет горещи извора, разположени в Югозападна България, демонстрираха възможност за разграждане на някоя от четирите тествани пластмаси, поликапролактон, поливинил алкохол, полистирен и полипропилен като единствен източник на въглерод. Най-висока разграждаща активност беше наблюдавана спрямо поликапролактон при пробата от извор Марикостиново.
2. Чрез метагеномен анализ беше установено намаляване на естественото филогенетично разнообразие в съобществото, култивирано в присъствието на  $\epsilon$ -поликапролактон (7 таксономични групи) в сравнение със съобществото без пластмаса (11 таксономични групи).
3. Силно доминиране на типа *Proteobacteria* беше наблюдавано в минерална хранителна среда без пластмаса, докато в нейно присъствие доминиращи типове бяха представители на *Deinococcus -Thermus* и *Firmicutes*.
4. Естеразна активност спрямо поликапролактон беше установена при 12 изолата, като най-висока тя беше при *Brevibacillus thermoruber* щам 7.
5. При проследяване процеса на биоразграждане за четири седмици беше установена 100% загуба на физическото тегло на поликапролактоновите перли, докато при щам *B. thermoruber* 7 те губеха 63.6% от теглото си.
6. Чрез гел-пермеационен анализ бяха идентифицирани различни продукти от разграждането на поликапролактона под действието на съобществото и чистия щам, удостоверяващи участието на по-голям брой микроорганизми в разградния процес при съобществото.
7. С електронно-микроскопски анализ беше онагледена значителната деформация на пластмасата по време на процеса на разграждане с участие на микробното съобщество и *B. thermoruber* щам 7.
8. Чистият ензим показва молекулно тегло 28 kDa, температурен оптимум 55°C, рН оптимум 7.0-8.0 и висока термостабилност – неговият полуживот след предварително третиране при 60°C беше повече от пет часа.
9. Чрез сканираща електронна микроскопия (СЕМ анализ) се наблюдаваха значителни промени, като по-плитки или по-дълбоки гънки на повърхността на ПКЛ перли, инкубирани с ултраконцентрат или чист ензим.
10. Проби, събрани от лугата и водната кал на Атанасовско езеро, Бургаските

солници и Поморийски солници показаха естеразна активност при култивиране с пластмасите поликапролактон, поливинил алкохол, полистирен и полипропилен и предизвикаха значителни промени на пластмасовата повърхност, установени със сканираща електронна микроскопия.

11. Метагеномният анализ на съобществото от водата на Атанасовското езеро с ПКЛ разкри селективен натиск от пластмасата, водеща до разцвет на семейство *Halomonadaceae*, Гама-протеобактерия за сметка на Алфа-протеобактерия в контролата.
12. От изолираните и филогенетично определени 25 щама от проба 2 на поликапролактон, шест показаха естеразна активност, три при култивиране на ПВА и по един при култивиране на ПКЛ, ПП и ПС.

## Приноси

1. За първи път е изолирано бактериално съобщество, разграждащо пластмасата  $\epsilon$ -поликапролактон при 55°C - най-високата сред докладваните досега, при която се наблюдават благоприятстващи микробното действие промени в пластичните свойства на ПКЛ.
2. За първи път в термофилно и халофилно съобщества е наблюдаван силен селективен натиск върху биоразнообразието от използваната пластмаса ПКЛ като единствен въглероден източник.
3. Първият способен да разгражда поликапролактон термофилен бацил *Brevibacillus thermoruber* щам 7 е изолиран от термофилното съобщество от извор Марикостиново.
4. В резултат на установената висока ефективност на разграждане на 0.3% ПКЛ в средата, ПКЛ перлите се разграждат напълно за четири седмици. Постигната скорост на разграждане е сред най-високите съобщени при субстрат пластмаса.
5. Обяснен е механизмът на по-ефективно разграждане на ПКЛ от термофилното съобщество в сравнение с щам 7 с успоредното присъствие на микроорганизми, които усвояват олигомерите, получени от дейността на щам 7, както и такива, които благоприятстват образуването на биофилм върху ПКЛ повърхност.
6. Пречистената липаза е първият съобщен термостабилен ензим, способен да разгражда ПКЛ. Съпадението между температурния оптимум на липазата от щам 7 (55°C) и точката на топене на ПКЛ 55–60°C определя възможността за ефективен ензимен процес с участието на ултраконцентрат или чист ензим. Допълнителен принос към ефективен ензимен процес е широката рН област, в която ензимът е активен – над 80% при рН от 6.0 до 9.0.
7. Получените резултати предполагат ефективно приложение на изолираното съобщество, *B. thermoruber* щам 7 и синтезирания от него ензим за решаване на един от основните проблеми на нашето общество, а именно третирането на пластмасовите отпадъци.
8. Изолираните и филогенетично определени термофилни и халофилни щамове, способни да разграждат в различна степен поликапролактон, поливинил алкохол, полистирен и полипропилен са основа за бъдещи изследвания върху разграждането на пластмасите.

## **Публикации, свързани с дисертацията:**

1. **Atanasova, N.**, Stoitsova, S., Paunova-Krasteva, T., Kambourova, M. Plastic degradation by extremophilic bacteria. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 11, 2021, no 56. Q1, JCR IF (Scopus): 5.923
2. **Atanasova, N.**, Paunova-Krasteva, T., Stoitsova, S., Radchenkova, N., Boyazdhieva, I., Petrov, K., Kambourova, M. Degradation of poly( $\epsilon$ -caprolactone) by a thermophilic community and *Brevibacillus thermoruber* strain 7 isolated from Bulgarian hot spring. *Biomolecules*, 11, 10, MDPI, 2021, 1488. Q2, SJR (Scopus): 4.879
3. **Atanasova, N.**, Paunova-Krasteva, T., Stoitsova, S., Kambourova, M., Shapagin, A., Matveev, V., Provotorova, E., Elcheninov, A., Sokolov, T., Bonch-Osmolovskaya, E.. Plastic degradation by extremophilic microbial communities isolated from Bulgaria and Russia. *Ecologia Balkanica*, 13, 2, Plovdiv University, 2021, ISSN:1314-0213, 211-222. Q4, SJR (Scopus): 0.137
4. **Atanasova, N.**, Paunova-Krasteva, T., Kambourova, M., Boyazdhieva, I. A thermostable lipase isolated from *Brevibacillus thermoruber* strain 7 degrades  $\epsilon$ -polycaprolactone. *BioTech* 2023, 12(1), 23. Q2.

## **Открити цитати на публикациите, свързани с дисертационния труд:**

### **Цитирана публикация:**

Atanasova, N., Stoitsova, S., Paunova-Krasteva, T., Kambourova, M. (2021). Plastic degradation by extremophilic bacteria. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 11, no 56. Q1, SJR IF (Scopus): 5.923

### **Цитира се в:**

1. Borthakur, D., Rani, M., Das, K., Shah, M. P., B. K. Sharma (2021). Bioremediation: an alternative approach for detoxification of polymers from the contaminated environment. *Letters in Applied Microbiology*
2. Chattopadhyay, I. (2021). Role of microbiome and biofilm in environmental plastic degradation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, DOI:10.1016/j.bcab.2021.102263
3. Joshi, G., Goswami, P., Verma, P., Prakash, G., Simon, P., Vinithkumar, N. V., Dharani, G. (2021). Unraveling the Plastic Degradation Potentials of the Plastisphere-associated Marine Bacterial Consortium as a Key Player for the Low-density Polyethylene Degradation. *Journal of Hazardous Materials*. 7 December 2021, 128005. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2021.128005



4. Stabnikova, O., Stabnikov, V. , Marinin, A., Klavins, M., Klavins, L., Vaseashta, A. (2021). Microbial Life on the Surface of Microplastics in Natural Waters. *Applied Sciences* 11(24):11692. DOI: 10.3390/app112411692
5. Akarsu, C., Özdemir, S., Ozay, Y., Acer, Ö., Dizge, N. Investigation of two different size microplastic degradation ability of thermophilic bacteria using polyethylene polymers (2022) *Environmental Technology* (United Kingdom).
6. Alak, G., Köktürk, M., Ucar, A., Parlak, V., Kocaman, E. M., & Atamanalp, M. (2022). Thermal processing implications on microplastics in rainbow trout fillet. *Journal of Food Science*, 00, 1– 12.
7. Beloe, C.J., Browne, M.A., Johnston, E.L. 2022. Plastic Debris As a Vector for Bacterial Disease: An Interdisciplinary Systematic Review. *Environmental Science and Technology*. 56(5), pp. 2950-2958.
8. Borthakur, D., Rani, M., Das, K., Shah, M.P., Sharma, B.K., Kumar, A. Bioremediation: an alternative approach for detoxification of polymers from the contaminated environment (2022) *Letters in Applied Microbiology*, 75 (4), pp. 744-758.
9. Chao A, Chao AS, Lin CY, Weng CH, Wu RC, Yeh YM, Huang SS, Lee YS, Lai CH, Huang HJ, Tang YH, Lin YS, Wang CJ, Wu KY. Analysis of endometrial lavage microbiota reveals an increased relative abundance of the plastic-degrading bacteria *Bacillus pseudofirmus* and *Stenotrophomonas rhizophila* in women with endometrial cancer/endometrial hyperplasia. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022 Nov 9;12:1031967.
10. Chattopadhyay, I. Role of microbiome and biofilm in environmental plastic degradation (2022) *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 39, art. no. 102263.
11. Girish, H.V., Raghavendra, M.P. (2022). Role of Rhizobiome in Mitigating Plastic Pollution in Pedosphere. In: Giri, B., Kapoor, R., Wu, Q.S., Varma, A. (eds) *Structure and Functions of Pedosphere*. Springer, Singapore.
12. Herbert, J., Beckett, A.H., Robson, S.C. (2022). A Review of Cross-Disciplinary Approaches for the Identification of Novel Industrially Relevant Plastic-Degrading Enzymes. *Sustainability (Switzerland)* 14(23), 15898.
13. Herbert, J., Beckett, A.H., Robson, S.C. A Review of Cross-Disciplinary Approaches for the Identification of Novel Industrially Relevant Plastic-Degrading Enzymes (2022) *Sustainability (Switzerland)*, 14 (23), art. no. 15898.
14. Hualpa-Cutipa, E., Acosta, R.A.S., Cariga, O.J.M., Espinoza-Medina, M.A., Chavez-Rojas, D.C., Medina-Cerna, D., Centeno-Merino, L., Vasquez-Condori, G., Revollar-Panaifo, C.E., Hansen-Reyes, M., Salazar-Quiñonez, I. Metagenomic approach role of psychrotrophic and psychrophilic microbes in bioremediation (2022) *Metagenomics to Bioremediation: Applications, Cutting Edge Tools, and Future Outlook*, pp. 513-536.
15. Jiménez, D.J., Öztürk, B., Wei, R., D.ugg, T., Gomez, C.V.A., Galan, F.S., Castro-Mayorga, J.L., Saldarriaga, J.F., Tarazona, N.A. Merging Plastics, Microbes, and Enzymes: Highlights from an International Workshop (2022) *Applied and Environmental Microbiology*, 88 (14).
16. Jong-Hoon H., Hoon C., Gu P., Hwan P., Kwang-Hee S., Ho-Yong P. 2022. Polyurethane biodegradation by *Serratia* sp. HY-72 isolated from the intestine of the Asian mantis *Hierodula patellifera*. *Frontiers in Microbiology*. 13, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1005415>

17. Joshi, G., Goswami, P., Verma, P., Prakash, G., Simon, P., Vinithkumar, N.V., Dharani, G. Unraveling the plastic degradation potentials of the plastisphere-associated marine bacterial consortium as a key player for the low-density polyethylene degradation (2022) *Journal of Hazardous Materials*, 425, art. no. 128005.
18. Khan, Maham & Ashraf, Muhammad & Ishaque, Wajid & Ahsan, Muhammad & Sajid, Muhammad & Habib, Mudasser & Mehmood, Ansar. (2022). Efficiency of halophilic biofilm producing bacteria towards the degradation of plastic materials at optimum temperature. *Biomedical Letters*. 8. 136-143. DOI: 10.47262/BL/8.2.20220501.
19. Kim JH, Choi SH, Park MG, Park DH, Son KH, Park HY. Polyurethane biodegradation by *Serratia* sp. HY-72 isolated from the intestine of the Asian mantis *Hierodula patellifera*. *Front Microbiol*. 2022 Dec 19;13:1005415. doi: 10.3389/fmicb.2022.1005415. PMID: 36601396; PMCID: PMC9806174.
20. Kim, J.-H., Choi, S.H., Park, M.G., Park, D.H., Son, K.-H., Park, H.-Y. Biodegradation of polyurethane by Japanese carpenter bee gut-associated symbionts *Xanthomonas* sp. HY-71, and its potential application on bioconversion (2022) *Environmental Technology and Innovation*, 28, art. no. 102822.
21. Kochhar, N., Kavaya, I.K., Shrivastava, S., Ghosh, A., Rawat, V.S., Sodhi, K.K., Kumar, M. (2022). Perspectives on the microorganism of extreme environments and their applications *Current Research in Microbial Sciences*, 3, art. no. 100134.
22. Kour H., Khan S., Kour D., Rasool S., Sharma Y., Rai P., Singh S., Chaubey K., Rai A., Yadav A. (2022). Microbes mediated plastic degradation: A sustainable approach for environmental sustainability. *Journal of Applied Biology & Biotechnology* Vol. X(XX), pp. 1-11, 2022.
23. Özdemir, S.; Akarsu, C.; Acer, Ö.; Fouillaud, M.; Dufossé, L.; Dizge, N. Isolation of Thermophilic Bacteria and Investigation of Their Microplastic Degradation Ability Using Polyethylene Polymers. *Microorganisms* 2022, 10, 2441.
24. Sharma A., Devadas V., Nair P., Manpoong C., Kartha B. Biodegradation of Polymers with Microbial Agents. *Current Green Chemistry*. In Keglevich G. (Ed.), *Current Green Chemistry*. Publisher: Bentham Science Publishers. 9, 1, 2022, pp. 3-13(11).
25. Stabnikova, O., Marinin, A., & Stabnikov, V. (2022). Main trends in application of novel natural additives for food production. *Ukrainian Food Journal*, 10(3). DOI: 10.24263/2304-974X-2021-10-3-8.
26. Valdez-Nuñez LF, Rivera-Jacinto MA. Thermophilic bacteria from Peruvian hot springs with high potential application in environmental biotechnology. *Environ Technol*. 2022 Nov 10:1-16.
27. Walfridson, M., & Kuttainen Thyni, E. (2022). Automation of carbonyl index calculations for fast evaluation of microplastics degradation.
28. Wen, X., Yin, L., Zhou, Z., Kang, Z., Sun, Q., Zhang, Y., Long, Y., Nie, X., Wu, Z., Jiang, C. Microplastics can affect soil properties and chemical speciation of metals in yellow-brown soil (2022) *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 243, art. no. 113958.
29. Zhang, X., Peng, X. How long for plastics to decompose in the deep sea? (2022) *Geochemical Perspectives Letters*, 22, pp. 20-25.

30. Munishwar Nath Gupta, Vladimir N. Uversky, Chapter 1 - Enzymology: early insights, Editor(s): Munishwar Nath Gupta, Vladimir N. Uversky, In Foundations and Frontiers in Enzymology, Structure and Intrinsic Disorder in Enzymology, Academic Press, 2023, Pages 1-29.

**Цитирана публикация:**

Atanasova, N., Paunova-Krasteva, T., Stoitsova, S., Kambourova, M., Shapagin, A., Matveev, V., Provotorova, E., Elcheninov, A., Sokolov, T., Bonch-Osmolovskaya, E. (2021). Plastic degradation by extremophilic microbial communities isolated from Bulgaria and Russia. *Ecologia Balkanica*, 13, 2, Plovdiv University, ISSN:1314-0213, 211-222. Q4, SJR (Scopus):0.144

**Цитира се в:**

31. A.A. Laikova, A.A. Kovalev, D.A. Kovalev, E.A. Zhuravleva S.V. Shekhurdina, N.G. Loiko Yu.V. Litt. (2023). Feasibility of successive hydrogen and methane production in a single-reactor configuration of batch anaerobic digestion through bioaugmentation and stimulation of hydrogenase activity and direct interspecies electron transfer. *International Journal of Hydrogen Energy* Vol.48, 34, , Pp. 12646-12660.