

СПИСЪК С РЕЗИОМЕТА НА БЪЛГАРСКИ И АНГЛИЙСКИ ЕЗИК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ ЗА УЧАСТИЕ В НАСТОЯЩИЯ КОНКУРС

на гл. ас. д-р Венелин Нейчев Хубенов

1. Lyudmila Kabaivanova, Ivan Simeonov, Dencho Denchev, Venelin Hubenov, Snejanka Mihaylova. Anaerobic co-digestion of cattle manure and pretreated wheat straw at two temperature regimes for biomethane production. Proceedings of national scientific conference with international participation Ecology and Health, 2016, ISSN:2367-9530

Abstract: Involving anaerobic biodegradation of organic wastes by a specific microbial community and defined conditions combines the breakdown of wastes with opportunities to obtain the energy carrier methane. Biotechnological processes in two laboratory bioreactors operating at 35°C and 55°C were studied to follow the process of methane production. Cattle manure and wheat straw were involved in a ratio 65:35 as well as only wheat straw as a sole substrate. The different chemical composition of both substrates used has its impact on the efficiency of their conversion. The differences in the chemical composition of the substrates used have a direct impact on the efficiency of their conversion. Microbial digestion of lignocellulose contained in the agricultural wastes is difficult to accomplish and it is slow because of the presence of lignin. This is the reason why different types of pretreatment were applied prior to substrate biodegradation. To enhance the enzymatic and microbial accessibility, preliminary treatment was identified as an obligatory step before accomplishment of the whole complex biotechnological process.

Резюме: Анаеробното биоразграждане на органични отпадъци от специфично микробно съобщество при определени условия съчетава разграждането на отпадъците с възможности за получаване на енергийния носител метан. Биотехнологичните процеси в два лабораторни биореактора, работещи при 35°C и 55°C, бяха изследвани, за да се проследи процесът на производство на метан. Използвани са говежди тор и пшенична слама в съотношение 65:35, както и само пшенична слама като единствен субстрат. Различният химичен състав на двата използвани субстрата оказва влияние върху ефективността на тяхната биодеградация. Разликите в химичния състав на използваните субстрати имат пряко влияние върху ефективността на тяхното преобразуване. Микробното разграждане на лигноцелулозата, съдържаща се в селскостопанските отпадъци, е трудно осъществимо и е бавно поради наличието на лигнин. Това е причината, поради която преди анаеробната биодеградация на субстрата той беше подложен на различни видове предварителна обработка. За да се подобри ензимната и микробна достъпност, предварителната обработка е задължителна стъпка преди завършване на сложния биотехнологичен процес.

2. Lyudmila Kabaivanova, Ivan Simeonov, Dencho Denchev, Snejanka Mihaylova, Venelin Hubenov, Radoslava Nikolova, Donka Todorova. Thermochemical pretreatment of

lignocellulosic substrates for anaerobic digestion at mesophilic and thermophilic conditions. Ecological Engineering and Environment Protection, VII, 2016, 42-49

Abstract. Finding a method for effective pretreatment of lignocellulosic wastes for further use as a substrate for anaerobic digestion was the main purpose of our study. Lignocellulosic biomass is a renewable inexpensive source, abundant in nature. Involving anaerobic biodegradation of organic wastes by a specific microbial community and defined conditions combines the breakdown of wastes with opportunities to obtain the energy carrier methane. In this study we report on the pretreatment technique with ammonium hydroxide (NH₄OH) and polyethylene glycol (PEG) which was easy to perform and lead to increased biomethane yield (percent of methane in the biogas).

Резюме. Основната цел на нашето изследване беше намирането на метод за ефективно предварително третиране на лигноцелулозни отпадъци с цел по-нататъшно използване като субстрат за анаеробно разграждане. Лигноцелулозната биомаса е възобновяем евтин суровинен източник, и широко разпространен. Анаеробната биодеградация на органични отпадъци от специфично микробно съобщество и определени условия съчетава разграждането на отпадъците с възможности за получаване на енергийния носител метан. В това изследване докладваме техника за предварително третиране с амониев хидроксид (NH₄OH) и полиетиленгликол (ПЕГ), която беше лесна за изпълнение и доведе до повишен добив на метан (процентно съдържание на метан в биогаза).

3. D. Denchev, V. Hubenov, I. Simeonov, L. Kabaivanova. Biohydrogen production from lignocellulosic waste with anaerobic bacteria. The 4th International Conference on Water, Energy and Environment (ICWEE), Burgas, BULGARIA | June 1-2, 2016, 2016

ABSTRACT. Biohydrogen production through dark fermentation using organic waste as a substrate as gained increasing attention in recent years, owing to the economic advantages of coupling renewable, clean energy production with biological waste treatment. Biomass in its different forms is available for the production of renewable energy. Hydrogen is mainly used as a reducing agent in the refining of oils, ammonia and methanol production. Recently it is used in the fuel cells. The purpose of the present work is to study the influence of the inoculums on the biodegradation of lignocellulosic waste (wheat straw) and production of hydrogen through acidogenic phase of an anaerobic microbiological process. The results from this study reveal that the use of cells separated as inoculums stabilize the process and it takes place without given methane release. For obtaining good yields of hydrogen it is necessary to provide as inoculum at least 100 mg dry cell weight per 1 gram of substrate. The hydrogen concentration into the biogas reached 20-40 %. The maximum yield of hydrogen and the degree of biodegradation is obtained by alkali-treated straw. In the composition of volatile solids acetate and butyrate prevail. Bacteria from the genus *Clostridia* are dominating in the composition of microbial community performing the process. The two-phase process allows the energy yield to be increased by 34.3% compared to the single-phase process.

РЕЗЮМЕ. Производството на водород чрез т.нар. тъмна ферментация с използване на органични отпадъци като субстрат привлича все по-голямо внимание през последните години, благодарение на икономическите предимства от съчетаването на производството на възобновяема, чиста енергия с биологичното третиране на отпадъците. Биомасата в

различните ѝ форми е достъпна за производство на възобновяема енергия. Водородът се използва главно като редуциращ агент при рафинирането на нефт, производството на амоняк и метанол. Напоследък се използва и в горивните клетки. Целта на настоящата работа е да се проучи влиянието на инокулума върху биоразграждането на лигноцелулозни отпадъци (пшенична слама) и производството на водород чрез ацидогенна фаза на анаеробен микробиологичен процес. Резултатите от това проучване показват, че използването на микробни клетки, отделени като инокулуми, стабилизира процеса и той протича без отделяне на метан. За получаване на добри добиви на водород е необходимо да се осигури като инокулум поне 100 mg сухо клетъчно тегло на 1 грам субстрат. Концентрацията на водород в биогаза достигна 20-40%. Максималният добив на водород и степента на биоразграждане са постигнати при използването на алкално обработена слама. В състава на органичното вещество преобладават ацетатът и бутиратът. Бактерии от рода *Clostridia* доминират в състава на микробното съобщество, извършващо процеса. Двустъпалния процес позволява увеличаване на добива на енергия с 34,3% в сравнение с еднофазния процес.

4. I. Simeonov, D. Denchev, L. Kabaivanova, E. Krumova, E. Chorukova, V. Hubenov, S. Mihailova. Different types of pretreatment of lignocellulosic wastes for methane production. *Bulgarian Chemical Communications*, 49, (2), 2017, 430-435.

Biotechnological processes for anaerobic digestion of lignocellulosic substrates were performed in a laboratory bioreactor. Bioreactors used were operating at 35°C to follow the process of methane production. Cattle manure and wheat straw were involved in a ratio of 65:35 as a substrate, as well as only wheat straw as a sole substrate. We report on performing two pretreatment techniques to the substrates - chemical with ammonium hydroxide (NH₄OH) and polyethylene glycol (PEG) and biological – employing white-rot basidiomycetes (*Trametes hirsuta*) before starting the process of anaerobic digestion. The biological method of pretreatment gave the highest cumulative biogas yield for the substrate wheat straw and cattle manure. Chemical pretreatment lead to higher specific biogas yield when only wheat straw was used as a substrate. Both methods were easy to perform and lead to increased biomethane yield in comparison to that obtained with the participation of untreated substrates.

Осъществени са биотехнологични процеси на анаеробна деградация на лигноцелулозни субстрати в лабораторен биореактор. Използваните биореактори работиха при 35°C и беше проследен процеса на продукция на метан. Оборски тор и пшенична слама се използват като субстрат в съотношение 65:35, както и само пшенична слама като единствен субстрат. Ние докладваме за прилагането на две техники на предварително третиране на субстратите – химическо с амониев хидроксид (NH₄OH) и полиетилен гликол (PEG) и биологическо – с участието на дървесина-разлагащи базидиомицети (*Trametes hirsuta*) преди стартиране на процеса в анаеробния реактор. Биологичният метод на претретиране доведе до най-висок кумулативен добив на биогаз при субстрат оборски тор и пшенична слама. При химическото претретиране се получи по – висок специфичен добив на биогаз, когато само пшенична слама се използва за субстрат. И двата метода са лесни за осъществяване и водят до увеличен добив на биометан в сравнение с този, получен с участие на нетретирани субстрати.

5. Najdenski, H., Plyin, V., Angelov, P., Hubenov, V., Korshunov, D., Kussovski, V., Dimitrova, L., Simeonov, I. Laboratory biodegradation of potential cellulose wastes generated

during long-term manned space missions. *Ecological Engineering and Environment Protection*, 1, 2019, ISSN:1311-8668, DOI:doi.org/10.32006/eeep.2019.1.7178, 71-78

Abstract: Anaerobic microbial biodegradation of cellulose containing wastes generated during the long-term manned space missions is a key technological approach for resolving the problem of wastes accumulated onboard of the spacecraft. Herewith are presented data on the possibilities of structurally stable multispecies microbial consortia originating from methanogenic bioreactors to decompose different cellulose substrates – filter paper, medical gauze and vegetable mix as potential cellulose wastes during space missions. The rates of biodegradation processes carried out at mesophilic and thermophilic conditions are not only measured and compared but are providing new opportunities for development of technology for microbial biodegradation of cellulose-rich organic wastes. Moreover, the studies have shown that paper and gauze hydrolysis with the help of cellulolytic bacterial communities can be an effective component of utilization of cosmonaut hygiene items. Biodegradation of plant wastes by community of anaerobic bacteria is promising and applicable tool also under terrestrial conditions. Light microscopy of bacterial communities reveals the presence of Gram-positive spore forming bacilli (short and long forms, bipolar and dividing cells) and typical clostridia forms.

Резюме: Анаеробното микробно биоразграждане на целулозосъдържащи отпадъци, генерирани по време на дългосрочни пилотирани космически мисии, е ключов технологичен подход за решаване на проблема с отпадъците, натрупвани на борда на космически кораби. Представени са данни за възможностите на структурно стабилни многовидови микробни консорциуми, произхождащи от метаногенни биореактори, да разграждат различни целулозни субстрати – филтърна хартия, медицинска марля и растителна смес като потенциални целулозни отпадъци по време на космически мисии. Скоростите на биоразграждане, провеждано при мезофилни и термофилни условия, не само са измерени и сравнени, но и предоставят нови възможности за разработване на технологии за микробна биодеградация на богати на целулоза органични отпадъци. Освен това, проучванията показват, че хидролизата на хартия и марля с помощта на целулолитични бактериални съобщества може да бъде ефективна част от оползотворяване на хигиенни материали използвани от космонавтите. Биоразграждането на растителни отпадъци от съобщества от анаеробни бактерии е обещаващ и приложим подход и при наземни условия. Светлинната микроскопия на бактериалните съобщества разкрива наличието на Грам-положителни спорообразуващи бацили (къси и дълги форми, биполярни и дялящи се клетки) и типични клостридиални форми.

6. Hristo Najdenski, Venelin Hubenov, Ivan Simeonov, Veselin Kussovski, Lyudmila Dimitrova, Penka Petrova, Plamen Angelov, Lyudmila Kabaivanova. *Microbial Biodegradation as an Option for Waste Utilization during Long Term Manned Space Missions. Bulgarian Chemical Communications*, 52, 3, 2020, ISSN:0324-1130, DOI:10.34049/bcc.52.3.5227, 379-386.

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.

Планираните космически полети до Марс в обозримо бъдеще поставят много важни въпроси, които трябва да бъдат решени от съвременната наука, особено проблема с натрупаваните в големи количества органични отпадъци. Полетът от Земята до Марс отнема около 520 дни. При екипаж състоящ се от 6 космонавта, като всеки от тях се нуждае ежедневно от: кислород (1 кг течност), вода (1-2 литра), храна (2-3 кг) общото необходимо количество е около 5 кг/ден или 30 кг/ден за целия екипаж. По време на дългосрочни пилотирани мисии е забранено отпадъците да бъдат изхвърляни в космоса. Те трябва да бъдат рециклирани. Известно е, че специфични бактерии са способни да трансформират отпадъчните субстрати до използваеми хранителни вещества и минерали. Огромното предизвикателство е: намаляване на обема на отпадъците, и получаване на течни и газообразни фракции, които биха могли да се използват за производството на храна, вода и кислород. Едновременно с това се получава известно количество биогаз като източник на енергия. Представяме разработването на процес на биоразграждане на целулозо-съдържащи субстрати, подобни на материали за лична хигиена за космонавти, от избрани непатогенни бактерии. Експериментите бяха проведени в наземни условия, където беше постигната степен на биоразграждане на 72% от целулозата, съдържаща се в субстратите, при анаеробни, мезофилни условия. Избраното бактериално съобщество беше генетично идентифицирано. Най-разпространените видове бяха *Bacteroides oleiciplenus*, *Clostridium butyricum* и *Ruminiclostridium papyrosolvens*. Анализирани бяха и концентрацията и компонентния състав на летливите мастни киселини, съпътстващи процеса на биоразграждане в биореактор.

7. Lyudmila V. Kabaivanova, Hristo M. Najdenski, Venelin N. Hubenov, Elena I. Chorukova, Ivan Simeonov, Juliana G. Ivanova. Biotechnological exploitation of lignocellulosic wastes for biomethane production and algae cultivation in the digestate. International Journal of Pharma Medicine and Biological Sciences, 9, 4, 2020, ISSN:ISSN 2278-5221, 152-157.

The use of renewable energy sources and applying appropriate conditions for realization of anaerobic digestion of agricultural waste is carried out for obtaining higher yields of biomethane as an energy carrier. The influence of substrate type, quantity and pretreatment,

together with temperature regime on biomethane production was estimated. Both substrates generated higher biogas yields at the higher temperature regime and after pretreatment. The organic loading of 35 g/L was found to be most appropriate. The obtained liquid phase of anaerobic digestate was utilized as medium to maintain and enhance green microalgal growth. The ability of microalgae to photosynthetically fix carbon dioxide producing various biologically active substances, their short growth cycle and easy accumulation of biomass was involved. Due to their ability to colonize different environments these microorganisms represent promising sources for new products and applications. Good growth and development was observed for the microalga *Scenedesmus acutus* in digestate after adsorption with active carbon, using the macro and micronutrients present. This approach may lead to reducing costs and environmental impacts. Accumulated algal biomass (5 g/L) was afterwards introduced back in the reactor, realizing twice increased quantity of biogas on the second day of the anaerobic digestion process, generating biomethane.

Използването на възобновяеми енергийни източници и прилагането на подходящи условия за осъществяване на анаеробно разграждане на селскостопански отпадъци се извършва за получаване на по-високи добиви на метан като енергиен носител. Оценено е влиянието на вида на субстрата, количеството и предварителната обработка, заедно с температурния режим, върху производството на метан. И двата субстрата генерират по-високи добиви на биогаз при по-висок температурен режим и след предварителна обработка. Органичното натоварване от 35 g/L се оказва най-подходящо. Получената течна фаза на биошлама беше използвана като среда за поддържане и подобряване на растежа на зелените микроводорасли. Показана е способността на микроводораслите фотосинтетично да фиксират въглероден диоксид, произвеждайки различни биологично активни вещества, краткият им цикъл на растеж и лесното натрупване на биомаса. Поради способността им да колонизират различни среди, тези микроорганизми представляват обещаващи източници за нови продукти и приложения. Наблюдаван е добър растеж и развитие на микроводораслото *Scenedesmus acutus* в биошлама след адсорбция с активен въглен, използвайки наличните макро- и микроелементи. Този подход може да доведе до намаляване на разходите и въздействието върху околната среда. Натрупаната биомаса от водорасли (5 g/L) впоследствие беше въведена обратно в реактора, реализирайки двойно увеличено количество биогаз на втория ден от процеса на анаеробно разграждане.

8. Venelin Hubenov, Ramiro Ariel Carcioch, Juliana Ivanova, Ivanina Vasileva, Krasimir Dimitrov, Ivan Simeonov, Lyudmila Kabaivanova. Biomethane production using ultrasound pre-treated maize stalks with subsequent microalgae cultivation. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 34, 1, 2020

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 co-digested 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.

Това проучване използва възобновяем енергиен източник, селскостопански отпадъци, в анаеробно разграждане при подходящи условия за получаване на биогаз и метан като енергиен носител. Царевичните стъбла са претърпели предварителна ултразвукова обработка с ултразвук (УЗ) за подобряване на тяхната достъпност за микроорганизмите, тъй като лигноцелулозните суровини имат стабилна структура, неразтворими са във вода и са устойчиви както на механични, така и на ензимни въздействия. Биошламът след анаеробен процес на разграждане е използван допълнително за култивиране на водорасли след адсорбция с активен въглен за избистряне. Фотосинтетичните микроводорасли имат индустриални и икономически перспективи, така че тяхното нискобюджетно култивиране има голям потенциал за много приложения. Резултатите показват въздействието на предварителната ултразвукова обработка на царевични стъбла като единствен субстрат и при съвместното им разграждане с водораслова биомаса. Общите добиви са 1116 cm³/L, 1350.5 cm³/L и 1293.25 cm³/L за нетретираните, предварително обработени с ултразвук и с микровълни царевични стъбла. Демонстрирана е възможността за натрупване на водораслова биомаса, използвайки биошлама като среда. Предварителната обработка с УЗ (400 W) показва висока ефективност по отношение на получените екстрахируеми вещества на единица вложена енергия. Добавянето на 4 g/L биомаса от микроводорасли като допълнителен субстрат доведе до увеличаване на добива на биогаз в сравнение с нетретираните стъбла. Реализирана е малка затворена кръгова система, започваща от анаеробно разграждане на лигноцелулозни субстрати, последвано от култивиране на микроводорасли в биошлама и последващо връщане на биомасата от микроводорасли обратно в биореактора като допълнителен субстрат, насърчавайки кръговата икономика. Предложената схема е проста и нискобюджетна технология, тъй като използваният субстрат е свободно достъпен и възобновяем, а за водораслите е доказана възможността да растат в отпадъчния ефлуент в качеството му на среда.

9. Hubenov, V., Miteva-Staleva, J., Eneva, R., Boteva, N., Kabaivanova, L. Two-phase anaerobic digestion of wheat straw using immobilized microbial consortia. *Ecological Engineering and Environment Protection*, 3, 2021, ISSN:1311-8668, DOI:doi.org/10.32006/eeep.2022.1.3544, 35-44

Abstract: The serious energy and environmental problems associated with the use of fossil fuels necessitate the search for alternative energy sources. One of the modern approaches is the

anaerobic degradation of organic waste from agricultural wastes. The hydrogen and methane thus obtained are sources of environmentally friendly energy, which reduces carbon dioxide emissions from fossil fuels, as well as gaseous emissions resulting from natural degradation processes in the disposal of waste materials. The described two-stage anaerobic digestion (TPAD) system with an immobilized microbial consortium represents an innovative biotechnological approach that seeks to obtain an increased energy yield and raised degree of processing of waste materials. Some additional raw materials which represent waste materials from other industrial scale processes can be successfully applied and support higher biohydrogen production from wheat straw. The temperature regime suitable for wheat straw biodegradation is 55°C resulting in 2.5 time more biohydrogen production. The VFAs obtained from BR-1 are suitable substrate for the immobilized microbial consortia which is formed for nearly twenty days of bioreactor maintenance.

Резюме: Сериозните енергийни и екологични проблеми, свързани с използването на изкопаеми горива, налагат търсенето на алтернативни енергийни източници. Един от съвременните подходи е анаеробното разграждане на органични отпадъци от селското стопанство. Така получените водород и метан са източници на екологично чиста енергия, която намалява емисиите на въглероден диоксид от изкопаемите горива, както и газообразните емисии, произтичащи от естествените процеси на разграждане при изхвърлянето на отпадъчни материали. Описаната двустепенна система за анаеробно разграждане (TPAD) с имобилизиран микробен консорциум представлява иновативен биотехнологичен подход, който се стреми да получи повишен добив на енергия и повишена степен на разграждане на отпадъчните материали. Някои допълнителни суровини, които представляват отпадъчни материали от други индустриални процеси, могат успешно да се прилагат и да подпомагат повишаването на добивите на водород от пшенична слама. Температурният режим, подходящ за биодegradация на пшенична слама, е 55°C, което води до 2,5 пъти повишено производство на водород. Летливите маслените киселини, получени в БР-1, са подходящ субстрат за имобилизираните микробни консорциуми, който се формира за близо двадесет дни работа на биореактора.

10. Najdenski, H., Dimitrova, L., Akivanov, V., Hubenov, V., Mihailova, S., Grozdanov, P., Iliev, M., Kussovski, V., Kabaivanova, L., Simeonov, I. Anaerobic digestion of wheat straw and microbiological assesment of the resulted digestate. Ecological Engineering and Environment Protection, 1, 2021, ISSN:1311-8668, doi.org/10.32006/eeep.2021.1.4960, 49-60

Abstract: A study on the anaerobic digestion of wheat straw in a pilot scale bioreactor with an organic load of 2, 5, 7, 10 and 20 g/l and a process duration of 18 to 80 days was performed. The pilot bioreactor used has a computerized system for control and monitoring of various operational parameters – temperature, pH, biogas composition, etc. Total solids, total organics and volatile fatty acids were measured by standard methods and gas chromatography. Daily biogas yield and its main components (CH₄, CO₂, H₂S) were analysed too. During the anaerobic digestion, different species of microorganisms have been isolated from the genera *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterococcus* and *Aeromonas*, as well as the species *Terribacillus halophilus*. With a known pathogenic potential are described *Pseudomonas sp.*, *Enterococcus sp.* and *Aeromonas sp.* Studies on the antimicrobial resistance of all isolated strains show resistance to

ampicillin, amoxicillin, bacitracin, ceftriaxone, gentamicin and vancomycin. The cellulose degrading activity of some of the bacterial isolates, their pathogenic potential and antimicrobial resistance are discussed in detail in the light of the data on the mechanisms of proven resistance.

Резюме: Проведено е изследване на анаеробното разграждане на пшенична слама в пилотен биореактор с органично натоварване от 2, 5, 7, 10 и 20 g/l и продължителност на процеса от 18 до 80 дни. Използваният пилотен биореактор разполага с компютъризирана система за контрол и наблюдение на различни оперативни параметри – температура, рН, състав на биогаза и др. Общото количество сухо вещество, общото количество органични вещества и летливите мастни киселини са измерени чрез стандартни методи и газова хроматография. Анализирани са и дневният добив на биогаз и основните му компоненти (CH₄, CO₂, H₂S). По време на анаеробното разграждане са изолирани различни видове микроорганизми от родовете *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterococcus* и *Aeromonas*, както и вида *Terribacillus halophilus*. С известен патогенен потенциал са описани *Pseudomonas sp.*, *Enterococcus sp.* и *Aeromonas sp.* Проучвания върху антимикробната резистентност на всички изолирани щамове показват резистентност към ампицилин, амоксицилин, бацитрацин, цефтриаксон, гентамицин и ванкомицин. Целулозоразграждащата активност на някои от бактериалните изолати, техният патогенен потенциал и антимикробна резистентност са обсъдени подробно в светлината на данните за механизмите на доказана резистентност.

11. Simeonov I., Hubenov V., Chorukova E.. Renewable energy from two-stage anaerobic digestion of organic wastes. 17th Conference on Electrical Machines, Drives and Power Systems (ELMA), 2021, DOI:10.1109/ELMA52514.2021.9503067

Experimental studies of two-phase anaerobic digestion of corn steep liquor (a waste product from processing corn grain for starch extraction) were performed. For the first time, an automatic mode of operation was implemented in continuous processes with simultaneous production of hydrogen and methane using the developed computer system for monitoring and control of pilot bioreactors. The best results for daily biogas yield were obtained at an organic load of 20 g/L for hydrogen producing bioreactor, as the daily yield of biohydrogen is 0.74 dm³/L at a hydrogen concentration in biogas of 32.6% (0.24 dm³/L pure biohydrogen) and the daily biomethane yield in the methane producing bioreactor is 0.587 dm³/L at a methane concentration in biogas of 69% (0.4 dm³/L pure biomethane). The obtained energy is more than 40% compared to the traditional single-stage methane production process. A disadvantage is the need for additional purification from hydrogen sulfide of both gases before obtaining electricity and/or heat.

Проведени са експериментални изследвания на двуфазно анаеробно разграждане на царевичен екстракт (отпадъчен продукт от преработката на царевично зърно за екстракция на нишесте). За първи път е реализиран автоматичен режим на работа в непрекъснати процеси с едновременно производство на водород и метан, използвайки разработената компютърна система за мониторинг и управление на пилотни биореактори. Най-добри резултати за дневен добив на биогаз са получени при органично натоварване от 20 g/L за биореактор, произвеждащ водород, като дневният добив на водорода е 0,74 dm³/L при концентрация на водород в биогаза от 32,6% (0,24 dm³/L чист биоводород), а дневният добив на метан в биореактора, произвеждащ метан, е 0,587

dm³/L при концентрация на метан в биогаза от 69% (0,4 dm³/L чист метан). Получената енергия е повече от 40% в сравнение с традиционния едноетапен процес на производство на метан. Недостатък е необходимостта от допълнително пречистване от сероводород и на двата газа преди прилагането им за получаване на електричество и/или топлина.

12. Chorukova E., Hubenov V., Gocheva Y., Simeonov I. Two-Phase Anaerobic Digestion of Corn Steep Liquor in Pilot Scale Biogas Plant with Automatic Control System with Simultaneous Hydrogen and Methane Production. *Applied Sciences*, 12, 12, MDPI, 2022, ISSN:20763417, DOI:10.3390/app12126274, 6274.

Experimental studies of two-phase anaerobic digestion of corn steep liquor in semi-continuous automatic and semi-automatic modes of operation of a cascade of two anaerobic bioreactors with monitoring and control systems were performed. Corn steep liquor—a waste product from the process of treating corn grain for starch extraction—was used as a substrate in the process of anaerobic digestion with simultaneous hydrogen and methane production. The daily yields of biohydrogen in bioreactor 1 of the cascade (with a working volume of 8 dm³) are variable. In good operation, they are in the range of 0.7 to 1.0 L of biogas from a 1 dm³ working volume of the bioreactor, and the optimal pH is in the range of 5.0–5.5. The concentration of hydrogen in the biogas from the hydrogen bioreactor 1 is in the range of 14–34.7%. The daily yields of biomethane in bioreactor 2 of the cascade (with a working volume of 80 dm³) vary in the range 0.4 to 0.85 L of biogas from a 1 dm³ working volume of the bioreactor, and the concentration of methane in the biogas from bioreactor 2 is high and remains practically constant (in the range 65–69%). At a dilution rate of 0.4 day⁻¹ and an organic loading rate of 20 g/L for bioreactor 1, respectively, and a dilution rate of 0.05 day⁻¹ for bioreactor 2, the best results were obtained. The computer control system is presented. Some energetical considerations were discussed.

Проведени са експериментални изследвания на двуфазно анаеробно разграждане на царевичен екстракт в полунепрекъснати автоматични и полуавтоматични режими на работа на каскада от два анаеробни биореактора със системи за мониторинг и контрол. Царевичния екстракт - отпадъчен продукт от процеса на обработка на царевично зърно за екстракция на нишесте - е използван като субстрат в процеса на анаеробно разграждане с едновременно производство на водород и метан. Дневните добиви на биоводород в биореактор 1 на каскадата (с работен обем 8 dm³) са променливи. При добра експлоатация те са в диапазона от 0,7 до 1,0 L биогаз от 1 dm³ работен обем на биореактора, а оптималното рН е в диапазона 5,0–5,5. Концентрацията на водород в биогаза от водородния биореактор 1 е в диапазона 14–34,7%. Дневните добиви на биометан в биореактор 2 от каскадата (с работен обем 80 dm³) варират в диапазона от 0,4 до 0,85 L биогаз от 1 dm³ работен обем на биореактора, а концентрацията на метан в биогаза от биореактор 2 е висока и остава практически постоянна (в диапазона 65–69%). Най-добри резултати са получени при скорост на разреждане от 0,4 ден⁻¹ и скорост на органично натоварване от 20 g/L съответно за биореактор 1 и скорост на разреждане от 0,05 ден⁻¹ за биореактор 2. Представена е компютърната система за управление. Обсъдени са някои енергетични аспекти.

13. Miteva-Staleva, J., Eneva, R., Hubenov, V. Fungi and Their Potential for Biofuels Production (Review). *Bulgarian Journal of Agricultural science*, 28, 2, 2022, ISSN:1310-0351, 265-270.

World production of wheat, rice, sugar cane, vegetables and corn has reached approximately 62 billion tons per year. Over 3,48 billion tons per year agricultural wastes are accumulated. Improper disposal of agricultural waste is one of the causes of environmental pollution. Biodegradation of plant residues for biofuel production has become a modern alternative for the treatment of agricultural waste. Fungi producing lignocellulolytic enzymes include species of *Ascomycetes*, *Basidiomycetes*, and several anaerobic species that break down cellulose in the gastrointestinal tract of ruminants and some halophilic fungi. Anaerobic gut fungi have attracted huge interest as the most active cellulose degraders in nature. Some industrial production processes are carried out in the presence of high concentrations of NaCl. In such conditions, halophilic fungi with cellulase activity are already reported to be used in direct production of ethanol and butanol.

Световното производство на пшеница, ориз, захарна тръстика, зеленчуци и царевица е достигнало приблизително 62 милиарда тона годишно. Над 3,48 милиарда тона селскостопански отпадъци се натрупват годишно. Неправилното изхвърляне на селскостопански отпадъци е една от причините за замърсяване на околната среда. Биоразграждането на растителни остатъци за производство на биогорива се е превърнало в съвременна алтернатива за третиране на селскостопански отпадъци. Гъбите, произвеждащи лигноцелулолитични ензими, включват видове *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* както и няколко анаеробни вида, които разграждат целулозата в стомашно-чревния тракт на преживните животни, както и някои халофилни гъби. Анаеробните чревни гъби са привлекли огромен интерес като едни от най-активните целулозани дегранти в природата. Някои промишлени производствени процеси се извършват в присъствието на високи концентрации на NaCl. Има съобщения за прилагане на халофилни гъби с целулазна активност за директно производство на етанол и бутанол.

14. Chorukova, E., Kabaivanova, L., Hubenov, V., Simeonov, I., Roeva, O.. Mathematical Model of a Thermophilic Anaerobic Digestion for Methane Production of Wheat Straw. Processes, 10, 4, MDPI, 2022, ISSN:2227-9717, DOI:<https://doi.org/10.3390/pr10040742>, 742.

This paper presents a newly created mathematical model of thermophilic anaerobic digestion of wheat straw carried out in a 2 dm³ bioreactor for methane production. Two batch processes, with 30 mL/dm³ and 35 mL/dm³ organic load, are carried out—one set for parameter identification and one set for model verification. The identification of model parameter values is based on dynamical experiments. It is fulfilled using two different techniques: deterministic sequential quadratic programming algorithm and metaheuristic genetic algorithm. Verification of the developed mathematical models is conducted based on the different data sets of the process. Both models predict the set of the experimental data for all considered process variables well. Genetic algorithm visually fits the data with a higher degree of accuracy, as confirmed by the numerical results for the objective function value.

Тази статия представя новосъздаден математически модел на термофилна анаеробна биодеградация на пшенична слама, проведена в биореактор с обем 2 dm³ за производство на метан. Проведени са два периодични процеса, с органично натоварване от 30 mL/dm³ и 35 mL/dm³ - единият за идентифициране на параметри, а другият за проверка на модела.

Идентифицирането на стойностите на параметрите на модела се основава на динамични експерименти. То се извършва с помощта на две различни техники: детерминистичен алгоритъм за последователно квадратично програмиране и метаевристичен генетичен алгоритъм. Проверката на разработените математически модели се извършва въз основа на различните набори от данни за процеса. И двата модела добре предсказват набора от експериментални данни за всички разглеждани променливи на процеса. Генетичният алгоритъм визуално пасва на данните с по-висока степен на точност, както е потвърдено от числените резултати за стойността на целевата функция.

15. Kabaivanova, L., Hubenov, V., Dimitrova, L., Simeonov, I., Wang, H., Petrova, P. Archaeal and Bacterial Content in a Two-Stage Anaerobic System for Efficient Energy Production from Agricultural Wastes. *Molecules*, 27, 5, MDPI, 2022, ISSN:1420-3049, DOI:10.3390/molecules27051512, 1512-1512.

Anaerobic digestion (AD) is a microbially-driven process enabling energy production. Microorganisms are the core of anaerobic digesters and play an important role in the succession of hydrolysis, acidogenesis, acetogenesis, and methanogenesis processes. The diversity of participating microbial communities can provide new information on digester performance for biomass valorization and biofuel production. In this study anaerobic systems were used, operating under mesophilic conditions that realized biodegradation processes of waste wheat straw pretreated with NaOH—a renewable source for hydrogen and methane production. These processes could be managed and optimized for hydrogen and methane separately but combining them in a two-stage system can lead to higher yields and a positive energy balance. The aim of the study was to depict a process of biohydrogen production from lignocellulosic waste followed by a second one leading to the production of biomethane. Archaeal and bacterial consortia in a two-stage system operating with wheat straw were identified for the first time and the role of the most important representatives was elucidated. The mixed cultures were identified by the molecular-biological methods of metagenomics. The results showed that biohydrogen generation is most probably due to the presence of *Proteiniphilum saccharofermentans*, which was 28.2% to 45.4% of the microbial community in the first and the second bioreactor, respectively. Archaeal representatives belonging to *Methanobacterium formicum* (0.71% of the community), *Methanosarcina spelaei* (0.03%), *Methanoxithrix soehngenii* (0.012%), and *Methanobacterium beijingense* (0.01%) were proven in the methane-generating reactor. The correlation between substrate degradation and biogas accumulation was calculated, together with the profile of fatty acids as intermediates produced during the processes. The hydrogen concentration in the biogas reached 14.43%, and the Methane concentration was 69%. Calculations of the energy yield during the two-stage process showed 1195.89 kWh·t⁻¹ compared to a 361.62 kWh·t⁻¹ cumulative yield of energy carrier for a one-stage process.

Анаеробната биодеградация (АБД) е микробиологичен процес, позволяващ получаването на енергия. Микроорганизмите са ключови за анаеробната биодеградация и играят важна роля в последователността на процесите на хидролиза, ацидогенеза, ацетогенеза и метаногенеза. Изследването на разнообразието на участващите микробни съобщества може да предостави нова информация за работата на биореакторите за оползотворяване на биомаса и производство на биогорива. В това проучване са използвани анаеробни системи, работещи при мезофилни условия, които реализират процеси на биоразграждане на предварително обработена с NaOH отпадъчна пшенична слама - възобновяем източник за производство на водород и метан. Тези процеси могат да бъдат управлявани и оптимизирани за получаване на водород и метан поотделно, но

комбинирането им в двустепенна система може да доведе до по-високи добиви и положителен енергиен баланс. Целта на изследването е да се представи процес за производство на водород от лигноцелулозни отпадъци, последван от втори, водещ до производството на метан. За първи път са идентифицирани археални и бактериални консорциуми в двустъпална система, работеща с пшенична слама, и е изяснена ролята на най-важните представители. Смесените култури са идентифицирани чрез молекулярно-биологични метагеномни методи. Резултатите показват, че генерирането на водород най-вероятно се дължи на наличието на *Proteiniphilum saccharofermentans*, който съставлява от 28,2% до 45,4% от микробната общност в първия и втория биореактор. В реактора за генериране на метан са доказани археални представители, принадлежащи към *Methanobacterium formicicum* (0,71% от общността), *Methanosarcina spelaei* (0,03%), *Methanothrix soehngenii* (0,012%) и *Methanobacterium beijingense* (0,01%). Изчислена е корелацията между разграждането на субстрата и натрупването на биогаз, заедно с профила на мастните киселини - междинни метаболити, получени по време на процесите. Концентрацията на водород в биогаза достига 14,43%, а концентрацията на метан е 69%. Изчисленията на добива на енергия по време на двустъпалния процес показват $1195,89 \text{ kWh}\cdot\text{t}^{-1}$ в сравнение с кумулативния добив на метан като енергиен носител от $361,62 \text{ kWh}\cdot\text{t}^{-1}$ за едностъпалния процес.

16. Хубенов В., Кабаиванова-Миланова К., Енева Р., Енгибаров С., Иванова Ю. Средство за обработка на отпадъчен биошлам за култивиране на микроводорасли, Полезен модел № BG 4295 U1/29.06.2022; Действащ.

Полезният модел се отнася до средство за обработка на отпадъчен биошлам от инсталациите за биогаз, по-специално на течната фракция на отпадъчен биошлам, за целите на култивиране на микроводорасли, характеризиращо се с това, че включва (g/L): калциев хлорид хексахидрат ($\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) - от 5.0 до 10.0 и активен въглен - от 20.0 до 40.0. Средството, съгласно полезния модел, позволява превръщането на отпадния продукт в подходяща за култивиране на микроводорасли хранителна среда и дава доказано добри резултати, както при култивиране на зелени водорасли, така и при някои видове червени водорасли, с което може да замени изцяло необходимостта от изготвяне на скъпоструващи хранителни среди. Получената биомаса от микроводорасли след това може да се използва за производство на биопродукти с висока стойност, за фуражи за добитък и др.

The utility model relates to a means for treating waste biosludge from biogas plants, in particular the liquid fraction of waste biosludge, for the purpose of cultivating microalgae, characterized by the fact that it comprises (g/L) Calcium chloride hexahydrate ($\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) from 5.0 to 10.0 and Activated Carbon from 20.0 to 40.0. The means, according to the utility model, allows the conversion of the waste product into a culture medium suitable for microalgae cultivation and gives proven good results, both in the cultivation of green algae and in some types of red algae, whereby it can replace entirely the need to prepare costly culture media. The resulting microalgae biomass can then be used for the production of high-value bio-products, livestock feed, etc.

17. Kabaivanova, L., Petrova, P., Hubenov, V., Simeonov, I. Biogas Production Potential of Thermophilic Anaerobic Biodegradation of Organic Waste by a Microbial Consortium Identified with Metagenomics.. *Life*, 12, 702, MDPI, 2022, ISSN:2075-1729, DOI:10.3390/life12050702

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%), *Gamma*proteobacteria (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.

Анаеробната биодеградация (АБД) е широко разпространен биологичен процес за третиране на органични отпадъци за производство на зелена енергия. В това проучване пшенична слама и царевични стъбла без никаква предварителна обработка, са прилагани като възобновяем източник, който да бъде използван в лабораторен биореактор за производство на биогаз/метан. Проследени са параметрите на процеса: температура, рН, общо съдържание на сухо вещество, органично сухо вещество, концентрация на летливи мастни киселини (ЛМК) 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 със субстрат, до 45 g/L. Понататъшното увеличаване на субстрата не е довело до увеличаване на натрупването на биогаз, вероятно поради инхибиране или ограничения в масопеноса. След 12-дневен процес на анаеробно разграждане, кумулативните обеми добиви на биогаз са били 4,78 L за 1 L от работния обем на биореактора с натоварване със субстрат 30 g/L пшенична слама, 7,39 L за 40 g/L и 8,22 L за 45 g/L. Степента на биодеградация е изчислена съответно на 68,9%, 74% и 72%. Разработен е бърз и ефективен процес за производство на биогаз от нативна пшенична слама, като най-високото количество дневно производство на биогаз се наблюдава между 2-ри и 5-ти ден. Концентрацията на метан в биогаза е 60%. Метагеномния анализ на бактериалното разнообразие показва, че повече от една трета от бактериите принадлежат към клас *Clostridia* (32,9%), следвани от *Bacteroidia* (21,5%), *Betaproteobacteria* (11,2%), *Gamma*proteobacteria (6,1%) и *Alphaproteobacteria* (5%). Най-известните родове сред тях са *Proteiniphilum*, *Proteiniborus* и *Pseudomonas*. Делът на археите е 1,37% от микрофлората в термофилния биореактор, като най-разпространени са родовете *Methanocorpusculum*, *Methanobacterium*, *Methanomassiliicoccus*, *Methanoculleus* и *Methanosarcina*. Познаването на микробиома, намиращ се в анаеробния биореактор, може да бъде допълнително използвано за разработването на по-ефективни процеси на база на идентифицирания консорциум.

18. Lyudmila Dimitrova, Venelin Hubenov, Lyudmila Kabaivanova, Yana Gocheva, Plamen Angelov, Hristo Najdenski. Bacterial degradation of cellulosic substrates under terrestrial and long term manned space mission conditions: A review (part I). *Ecological Engineering and Environment Protection*, 2, 2022, ISSN: 1311-8668; e-ISSN 2367-8429, DOI: 10.32006/eeep.2022.2.6067, 60-67

Abstract: The Earth and the lower atmosphere (troposphere and stratosphere) are constantly faced with numerous environmental challenges, one of which is the growing pollution due to the incineration of cellulose-containing waste with accumulating potential. In recent years scientists have focused on the complexity of ecological mechanisms in the biosphere of our planet - Earth, starting from laboratory, scaled and closed ecosystems. Onboard the spacecraft, textile products with antimicrobial properties are widely used which limits the spread of infections and ensures safety, comfort and resistance of the user. Another type of waste is the remains of sanitary and medical consumables, personal hygiene materials (e.g. wet and dry wipes, toilet paper, etc.), paper, inedible parts of greenhouse plants, etc., being usually subjected to microbial degradation. On Earth, the accumulation of these cellulose containing waste can cause serious environmental problems. Nowadays, many researchers are trying in experimental conditions on Earth to solve the problem of cellulose-containing waste by means of different approaches – burning, composting, burial, etc. The main risk and environmental problem is that the burial of waste in the soil and composting should contribute to the spread of microorganisms with pathogenic potential. Nevertheless, a promising approach is the microbial degradation of cellulose containing substrates realized by microbial consortia depending on the conditions of the surrounding environment. Therefore, the recent review aims to make a comparative analysis of the bacterial species involved in the degradation processes of cellulose-containing waste and to assess their potential for possible application in space conditions, including the International Space Station.

Резюме: Земята и долните слоеве на атмосферата (тропосфера и стратосфера) са постоянно изправени пред множество екологични предизвикателства, едно от които е нарастващото замърсяване поради изгарянето на отпадъци, съдържащи целулоза, които имат потенциал да се натрупват. През последните години учените се фокусират върху сложността на екологичните механизми в биосферата на нашата планета - Земя, започвайки от лабораторни, мащабни и затворени екосистеми. На борда на космически кораби широко се използват текстилни продукти с антимикробни свойства, което ограничава разпространението на инфекции и гарантира безопасност, комфорт и устойчивост на потребителя. Друг вид отпадъци са остатъците от санитарни и медицински консумативи, материали за лична хигиена (напр. мокри и сухи кърпички, тоалетна хартия и др.), хартия, негодни за консумация части от оранжерийни растения и др., които обикновено могат да бъдат подложени на микробно разграждане. На Земята натрупването на тези отпадъци, съдържащи целулоза, може да причини сериозни екологични проблеми. В днешно време много изследователи се опитват в експериментални условия на Земята да решат проблема с отпадъците, съдържащи целулоза, чрез различни подходи - изгаряне, компостиране, заравяне и др. Основният риск и екологичен проблем е, че заравянето на отпадъци в почвата и компостирането би могло да допринесе за разпространението на микроорганизми с патогенен потенциал. Въпреки това, обещаващ подход е микробното разграждане на целулозносъдържащи субстрати, осъществявано от микробни консорциуми в зависимост от условията на околната среда. Следователно, настоящия преглед има за цел да направи сравнителен

анализ на бактериалните видове, участващи в процесите на разграждане на целулозосъдържащи отпадъци, и да оцени техния потенциал за евентуално приложение в космически условия, включително на Международната космическа станция.

19. Lyudmila Kabaivanova, Juliana Ivanova, Elena Chorukova, Venelin Hubenov, Lilyana Nacheva, Ivan Simeonov. Algal Biomass Accumulation in Waste Digestate after Anaerobic Digestion of Wheat Straw. *Fermentation*, 8, 715, 2022.

Abstract: Cultivation of microalgae in waste digestate is a promising cost-effective and environmentally friendly strategy for algal biomass accumulation and valuable product production. Two different digestates obtained as by-products of the anaerobic fermentation at 35 °C and 55 °C of wheat straw as a renewable source for biogas production in laboratory-scale bioreactors were tested as cultivation media for microalgae after pretreatment with active carbon for clarification. The strains of microalgae involved were the red marine microalga *Porphyridium cruentum*, which reached 4.7 mg/mL dry matter when grown in thermophilic digestate and green freshwater microalga – *Scenedesmus acutus*, whose growth was the highest — 7.3 mg/mL in the mesophilic digestate. During cultivation, algae reduced the available nutrient components in the liquid digestate at the expense of increasing their biomass. This biomass can find further applications in cosmetics, pharmacy, and feed. The nitrogen and phosphorus uptake from both digestates during algae cultivation was monitored and modeled. The results led to the idea of nonlinear dynamic approximations with an exponential character. The purpose was to develop relatively simple nonlinear dynamic models based on available experimental data, as knowing the mechanisms of the considered processes can permit creating protocols for industrial-scale algal production toward obtaining economically valuable products from microalgae grown in organic waste digestate.

Резюме: Култивирането на микроводорасли в отпадъчен биошлам е обещаваща рентабилна и екологично чиста стратегия за натрупване на биомаса от водорасли и производство на ценни продукти. Два различни биошлама, получени като странични продукти от анаеробната ферментация при 35 °C и 55 °C на пшенична слама, като възобновяем източник за производство на биогаз в лабораторни биореактори, бяха тествани като култивационна среда за микроводорасли след предварителна обработка с активен въглен за обезцветяване. Щамовете на микроводораслите, участващи в изследването, бяха червеното морско микроводорасло *Porphyridium cruentum*, което достигна 4,7 mg/mL сухо вещество, когато се отглежда в термофилен биошлам, и зеленото сладководно микроводорасло *Scenedesmus acutus*, чийто растеж беше най-висок - 7,3 mg/mL в мезофилния биошлам. По време на култивирането, водораслите намалиха наличните хранителни компоненти в течния биошлам за сметка на увеличаване на своята биомаса. Тази биомаса може да намери допълнителни приложения в козметиката, фармацията и производството на фуражи. Поемането на азот и фосфор от двата биошлама по време на култивирането на водорасли беше наблюдавано и моделирано. Резултатите доведоха до идеята за нелинейни динамични апроксимации с експоненциален характер. Целта беше да се разработят относително прости нелинейни динамични модели, базирани на наличните експериментални данни, тъй като познаването на механизмите на разглежданите процеси може да позволи създаването на протоколи за производство на алги в индустриален мащаб за получаване на икономически ценни продукти от микроводорасли, отглеждани в биошлам от процеси на анаеробна биодегradация на органични отпадъци.

20. Stoyancheva, G., Kabaivanova, L., Hubenov, V., Chorukova, E. Metagenomic Analysis of Bacterial, Archaeal and Fungal Diversity in Two-Stage Anaerobic Biodegradation for Production of Hydrogen and Methane from Corn Steep Liquor. *Microorganisms*, 11, 5, 2023, 1263.

Abstract: The main purpose of this study was to identify the microbial communities (bacterial, archaeal and fungal) in a two-stage system of anaerobic bioreactors for the production of hydrogen and methane from the waste substrate—corn steep liquor. Wastes from the food industry are valuable resources with potential in biotechnological production because of their high organic matter contents. In addition, the production of hydrogen and methane, volatile fatty acids, reducing sugars and cellulose content was monitored. Two-stage anaerobic biodegradation processes were performed by microbial populations in the first hydrogen generating bioreactor (working volume of 3 dm³) and in the second methane-generating reactor (working volume of 15 dm³). Cumulative hydrogen yield reached 2000 cm³ or 670 cm³/L a day, while the methane production reached a maximum quantity of 3300 cm³ or 220 cm³/L a day. Microbial consortia in anaerobic digestion systems play an essential role for process optimization and biofuel production enhancement. The obtained results showed the possibility of conducting two separate processes—the hydrogenic (hydrolysis and acidogenesis) and methanogenic (acetogenesis and methanogenesis)—as two stages of anaerobic digestion to favor energy production under controlled conditions with corn steep liquor. The diversity of microorganisms as main participants in the processes in the bioreactors of the two-stage system was followed using metagenome sequencing and bioinformatics analysis. The obtained metagenomic data showed that the most abundant phylum in both bacterial communities was *Firmicutes* — 58.61% and 36.49% in bioreactors 1 and 2, respectively. Phylum *Actinobacteria* were found in significant quantities (22.91%) in the microbial community in Bioreactor 1, whereas in Bioreactor 2, they were 2.1%. *Bacteroidetes* are present in both bioreactors. Phylum *Euryarchaeota* made up 0.4% of the contents in the first bioreactor and 11.4% in the second. As the dominant genera among methanogenic archaea are *Methanotherix* (8.03%) and *Methanosarcina* (3.39%), the main fungal representatives were *Saccharomyces cerevisiae*. New knowledge of anaerobic digestion mediated by novel microbial consortia could be widely used to convert different wastes to green energy.

Резюме: Основната цел на това проучване беше да се идентифицират микробните съобщества (бактериални, археални и гъбни) в двустепенна система от анаеробни биореактори за производство на водород и метан от отпадъчния субстрат - царевичен екстракт. Отпадъците от хранително-вкусовата промишленост са ценни ресурси с потенциал в биотехнологичното производство поради високото им съдържание на органични вещества. Освен това беше наблюдавано производството на водород и метан, летливи мастни киселини, редуциращи захари и съдържание на целулоза. Двустъпалните анаеробни биодеградиционни процеси бяха реализирани от микробни популации в два биореактора в един биореактор, генериращ водород (работен обем 3 dm³) и във втори реактор, генериращ метан (работен обем 15 dm³). Кумулативният добив на водород достигна 2000 cm³ или 670 cm³/L на ден, докато производството на метан достигна максимално количество от 3300 cm³ или 220 cm³/L на ден. Микробните консорциуми в анаеробните системи за разграждане играят съществена роля за оптимизиране на процесите и подобряване на производството на биогорива. Получените резултати показват възможността за провеждане на два отделни процеса - хидрогенен (хидролиза и ацидогенеза) и метаногенен (ацетогенеза и метаногенеза) - като два етапа на анаеробно разграждане, които да благоприятстват производството на енергия при контролирани условия с царевичен екстракт. Разнообразието от микроорганизми като основни

участници в процесите в биореакторите на двустепенната система беше проследено с помощта на метагеномно секвениране и биоинформатичен анализ. Получените метагеномни данни показаха, че най-разпространени и в двете бактериални общности са представителите на *Firmicutes* - 58,61% и 36,49% в биореактори 1 и 2, съответно. Представителите на *Actinobacteria* са открити в значителни количества (22,91%) в микробното съобщество в Биореактор 1, докато в Биореактор 2 те са 2,1%. *Bacteroidetes* присъстват и в двата биореактора. *Euryarchaeota* съставлява 0,4% от съдържанието в първия биореактор и 11,4% във втория. Доминиращите родове сред метаногенните археи са *Methanothrix* (8,03%) и *Methanosarcina* (3,39%), а основните представители сред микроскопичните гъбички са *Saccharomyces cerevisiae*. Новите знания за анаеробното разграждане, медирано от нови микробни консорциуми, биха могли да бъдат широко използвани за преобразуване на различни отпадъци в зелена енергия.

21. Venelin Hubenov, Juliana Ivanova, Lilyana Nacheva, Lyudmila Kabaivanova. Agricultural waste utilization for biomethane and algae-based fertilizer production for circular economy. Bulgarian journal of agricultural science, 29, 6, 2023, 1022-1026. SJR (Scopus):0.216

After obtaining of biogas during the anaerobic digestion processes, the liquid fraction can be applied directly as fertilizer (if it meets the relevant sanitary and hygienic norms), or the rich in mineral composition digestate to be used as a medium for development of microalgae. The algal biomass thus obtained could be applied as fertilizer, and the unused part of it could be re-utilized as raw material in other methanation processes, alone or in combination with other raw materials or wastes. Microalgae can easily colonize different environments. These microorganisms represent promising sources for new products and applications. The obtained liquid phase of anaerobic digestate was utilized as medium for enhanced growth of green microalgae. The ability of microalgae to photosynthetically fix carbon dioxide with production of valuable substances, their short growth cycle and easy biomass accumulation was used. In this study, good growth and development was observed for the microalga *Scenedesmus obliquus* in digestate after a clarification process, based on the macro and micronutrients present therein. This approach may lead to reducing the production costs along with environmental impacts.

След получаване на биогаз по време на процесите на анаеробно разграждане, течната фракция може да се използва директно като тор (ако отговаря на съответните санитарни и хигиенни норми) или богатият на минерален състав биошлам да се използва като среда за развитие на микроводорасли. Така получената биомаса от водорасли може да се използва като тор, а неизползваната част от нея може да се използва повторно като суровина в други процеси на получаване на метан, самостоятелно или в комбинация с други суровини или отпадъци. Микроводораслите могат лесно да колонизират различни среди. Тези микроорганизми представляват обещаващи източници за нови продукти и приложения. Получената течна фракция на анаеробния биошлам беше използвана като среда за засилен растеж на зелени микроводорасли. Използвана е способността на микроводораслите да фиксират фотосинтетично въглероден диоксид и да произвеждат ценни вещества, както и техният кратък цикъл на растеж и лесно натрупване на биомаса. В това проучване е наблюдаван добър растеж и развитие на микроводораслото *Scenedesmus obliquus* в биошлама след процес на обезцветяване, въз основа на наличните макро и микроелементи в него. Този подход може да доведе до намаляване на производствените разходи, както и на въздействието върху околната среда.

22. Hubenov, V., Varbacheva, I., Kabaivanova, L. Impact of Waste Cooking Oils Addition on Thermophilic Dry Co-Digestion of Wheat Straw and Horse Manure for Renewable Energy Production in Two Stages.. *Life*, 14, 312, 2024

Abstract: Anaerobic co-digestion of waste wheat straw and horse manure in two steps was revealed as a promising option for renewable energy production in the form of hydrogen and methane. Addition of waste cooking oils, disposal of which could cause damage to health or the environment, as a third substrate for digestion, is suggested as an approach not only to help handle the increasing volume of food waste worldwide but also to improve process performance. In the present study, waste cooking oil, in a concentration of 5%, appeared to be a positive modulator of anaerobic digestion with the production of hydrogen and did not lead to inhibition of the hydrolysis phase. The overall efficiency of the two-stage anaerobic digestion of the mixture, which contains mainly lignocellulose waste, is positively dependent on thermochemical pretreatment with the alkali reagent ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), but elevated temperature (55 °C) and cooking oil addition revealed the opportunity to omit the pre-treatment step. Nevertheless, the overall energy production was lower due to the methane production step. However, the addition of waste cooking oils to the process in which lignocellulose is not pretreated (V3) led to an increase in the methane production and energy yield compared to V1. The anaerobic digestion of lignocellulosic waste is a complex process and comprises successive degradation pathways and syntrophic microbial associations' activities, so the division in two reactors ensured suitable conditions for the microorganisms residing in each of them. In this study, along with the production of hydrogen and methane and the separation of the hydrolysis and methanogenesis stages, utilization of agriculture- and kitchen-generated wastes was realized in the context of waste-to-energy sustainable production methods.

Резюме: Съвместното анаеробно разграждане на отпадъчна пшенична слама и конски тор в два етапа се оказва обещаваща опция за производство на възобновяема енергия под формата на водород и метан. Добавянето на отпадъчни готварски масла, чието изхвърляне може да бъде опасно за здравето или околната среда, като трети субстрат за разграждане, се предлага като подход не само за справяне с нарастващия обем хранителни отпадъци в световен мащаб, но и за подобряване на производителността на процеса. В настоящото проучване, отпадъчното готварско масло в концентрация от 5% се оказва положителен модулатор на анаеробното разграждане с производството на водород и не доведе до инхибиране на фазата на хидролиза. Общата ефективност на двустепенното анаеробно разграждане на сместа, която съдържа главно лигноцелулозни отпадъци, е положително зависима от термохимичната предварителна обработка с алкален реагент ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), но повишената температура (55 °C) и добавянето на готварско масло показват потенциална възможност за избягване на стъпката на предварителна обработка. Въпреки това, общото производство на енергия беше по-ниско поради по-ниската продукция на метан. Въпреки това, добавянето на отпадъчни готварски масла към процеса, в който лигноцелулозата не е предварително обработена (V3), доведе до увеличаване на производството на метан и сумарния добив на енергия в сравнение с V1. Анаеробното разграждане на лигноцелулозните отпадъци е сложен процес и включва последователни пътища на разграждане и активност на синтрофни микробни асоциации, така че разделянето му в два отделни биореактора може да осигури подходящи условия за микроорганизмите, пребиваващи във всеки от тях. В това изследване, наред с производството на водород и метан и разделянето на етапите на хидролиза и метаногенеза, оползотворяването на генерирани от селското стопанство и кухненски отпадъци беше осъществено в контекста на устойчивите методи за производство на енергия от отпадъци.

23. Kabaivanova, L., Hubenov, V., Dimitrov, N., Petrova, P. Anaerobic Two-Phase Co-Digestion for Renewable Energy Production: Estimating the Effect of Substrate Pretreatment, Hydraulic Retention Time and Participating Microbial Consortia. *Applied Sciences*, 14, 12, MDPI, 2024, ISSN:20763417, DOI:10.3390/app14125311, 5311.

Abstract: Green and sustainable economies have recently become a key issue in long-term growth and well-being. Co-digestion of various waste materials in an eco-friendly way through biogas production has become the preferred method for their utilization and valorization. The possibility of hydrogen and methane yield maximization depends on the most suitable alkali reagent for pretreatment of waste lignocellulosic material, which was revealed in batch tests to determine the hydrogen production potential. The mixture for digestion consisted of pretreated wheat straw mixed with waste algal biomass in a ratio of 80:20 (w/w). The maximum hydrogen yield was achieved after applying sodium hydroxide thermoalkaline pretreatment, with a two-fold higher yield than the untreated control. Hydrogen production was stable and methane was not present in the resultant gas. The influence of the hydraulic retention time (HRT) on the maintenance of cascade installation was studied. The maximum daily concentration of hydrogen was achieved at an HRT of 2 days—42.5% H₂—and the maximum concentration of methane was 56.1% at an HRT of 6 days. Accumulation of volatile fatty acids was registered in the first step and their depletion was noted in the second one. The obtained values of the cellulose content demonstrated that it was utilized by up to 2.75% in the methanogenic bioreactor at the end of the process. Metagenomics analyses revealed the bacteria *Thermocaproicibacter melissae* (44.9%) and *Clostridium cellulosi* (41.9%) participated in the consortium, accomplishing substrate hydrolysis and acidogenesis in the first stage. Less in abundance were *Thermoanaerobacterium butyriciformans*, *Calorimonas adulescens*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Anaerocolumna chitinilytica*. Methanogenesis was performed by an archaeon closely related to *Bathyarchaeota* (99.5%) and *Methanobacterium formicicum*. The most abundant bacterial strains in the methanogenic fermenter were *Abyssalbus ytuae* (30%), *Proteiniphilum acetatigenes* (26%) and *Ruficoccus amylovorans* (13%).

Резюме: Зелените и устойчиви икономики напоследък се превърнаха в ключов въпрос за дългосрочния растеж и благосъстояние. Съвместното разграждане на различни отпадъчни материали по екологичен начин чрез производство на биогаз се превърна в предпочитан метод за тяхното оползотворяване и остойностяване. Възможността за максимизиране на добива на водород и метан зависи от избора на подходящ алкален реагент за предварителна обработка на отпадъчен лигноцелулозен материал, което беше показано в периодични процеси за определяне на потенциала за производство на водород. Сместа за разграждане се състоеше от предварително обработена пшенична слама, смесена с отпадъчна биомаса от водорасли в съотношение 80:20 (w/w). Максималният добив на водород беше постигнат след прилагане на термоалкална предварителна обработка с натриева основа, с два пъти по-висок добив от нетретирания контрол. Производството на водород беше стабилно и в получения газ не се детектираше метан. Изследвано беше влиянието на времето на хидравлично задържане (HRT) върху работата на каскадната инсталация. Максималната дневна концентрация на водород бе постигната при HRT от 2 дни — 42,5% H₂ — а максималната концентрация на метан е 56,1% при HRT от 6 дни. Натрупване на летливи мастни киселини е регистрирано в първия етап, а изчерпването им се наблюдаваше във втория. Получените стойности на съдържанието на целулоза показват, че тя е била усвоена до 2,75% в метаногенния биореактор в края на процеса. Метагеномните анализи показват, че бактериите *Thermocaproicibacter melissae* (44,9%) и *Clostridium cellulosi* (41,9%)

участват в консорциума, осъществявайки хидролиза на субстрата и ацидогенеза в първия етап. По-малко разпространени са *Thermoanaerobacterium butyriciformans*, *Calorimonas adulescens*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Anaerocolumna chitinilytica*. Метаногенезата се извършва от археи, *Bathyarchaeota* (99,5%) и *Methanobacterium formicicum*. Най-разпространените бактериални щамове в метаногенния ферментатор са *Abyssalbus ytuae* (30%), *Proteiniphilum acetatigenes* (26%) и *Ruficoccus amylovorans* (13%).

24. V. N. Hubenov, G. D. Stoyancheva, M. D. Kaleva, L. V. Kabaivanova. Microbial diversity in immobilized biofilm from packed bed anaerobic bioreactor for biogas production. 18th IWA World Conference on Anaerobic Digestion, June 2-6, Istanbul – Turkiye 2024

Abstract: Lignocellulosic waste anaerobic digestion has a complex nature and is accomplished by successive degradation pathways and syntrophic microbial associations. Possible approach for improving this process is application of two-phase systems, in which, along with production of two energy carriers (hydrogen and methane), separation of the stages of hydrolysis and methanogenesis is also achieved. The separate progress of these phases is a prerequisite for better process management, more complete degradation of raw materials and obtaining products with high added value. Application of immobilized microorganisms in modern biochemical processes creates additional positive effects. In biogas technologies, the natural ability of cells to self-organize and self-attach in biogranules or to different surfaces to form biofilms is usually used. The purpose of this study was to investigate the microbial diversity in such kind of self-organized biofilms formed onto the metal mesh carrier in a packed bed bioreactor (second bioreactor), which served as a second phase for mesophilic methanogenesis in the two-phase anaerobic digestion system. The first hydrogenic bioreactor represents a continuous-stirred tank reactor, operating at thermophilic conditions. As raw material only mechanically pretreated wheat straw was co-digested in a mixture with corn steep liquor at a ratio 10:1 (w/w). Stable biogas production from the second bioreactor was observed after about twenty days of operation at low stirrer speed (25 rpm). Metagenomic analysis revealed the immobilized microbial structure. At a phylum level *Euryarchaeota* is predominant, followed by *Proteobacteria* and *Bacteroidetes*. Even though they are in small amounts, representatives from the phylum *Firmicutes* and *Actinobacteria* are also detected. *Methanosarcina* and *Methanotherix* are the main genera, followed by *Syntrophobacter* and *Lentimicrobium* species.

Резюме: Анаеробното разграждане на лигноцелулозни отпадъци има сложен характер и се осъществява чрез последователни пътища на разграждане от синтрофни микробни съобщества. Възможен подход за подобряване на този процес е прилагането на двустъпални системи, при които, наред с производството на два енергийни носителя (водород и метан), се постига и разделяне на етапите на хидролиза и метаногенеза. Разделното протичане на тези фази е предпоставка за по-добро управление на процеса, по-пълно разграждане на суровините и получаване на продукти с висока добавена стойност. Приложението на имобилизирани микроорганизми в съвременните биохимични процеси има допълнителни положителни ефекти. В биогазовите технологии обикновено се използва естествената способност на клетките да се самоорганизируют в биогранули или да се имобилизират към различни повърхности, и да образуват биофилми. Целта на това изследване беше да се изследва микробното разнообразие в такъв вид самоорганизиращи биофилми, образувани върху носител представляващ метална мрежа в биореактор с пълнежен слой (втори биореактор), който служи като втора фаза за мезофилна метаногенеза в двустъпална система за анаеробно разграждане. Първият биореактор (хидрогенен) представлява реактор с непрекъснато разбъркване,

работещ при термофилни условия. В качеството на суровина беше използвана пшенична слама която беше само механично обработена предварително и подложена на анаеробна биодеградация в смес с царевичен екстракт в съотношение 10:1 (w/w). Стабилно производство на биогаз от втория биореактор беше наблюдавано след около двадесет дни работа при ниска скорост на бъркалката (25 rpm). Метагеномният анализ разкри имобилизираната микробна структура. На ниво тип преобладават представителите на *Euryarchaeota*, следвани от *Proteobacteria* и *Bacteroidetes*. Въпреки че са в малки количества, са открити и представители от тип *Firmicutes* и *Actinobacteria*. *Mathanosarcina* и *Methanothrix* са основните родове, следвани от видове от *Syntrophobacter* и *Lentimicrobium*.

25. Zaharieva, K. L., Dimova, S. S., Eneva, R. T., Hubenov, V. N., Stambolova, I. D., Stoyanova, D. D., Ublekov, F. S., Dimitrov, O. S., Penchev, H. P. PLA/PVP/bio-synthesized hydrozincite nanocomposite films – photocatalytic and antibacterial activity. Bulgarian Chemical Communications, 56, 2, 2024, ISSN:0324-1130, DOI: 10.34049/bcc.56.2.SPSCBT-05, 164-168.

Nanocomposite films based on biodegradable polylactic acid (PLA) and PLA/polyvinylpyrrolidone (PVP) with embedded stabilized Hydrozincite powder were synthesized by solution casting method. The Hydrozincite was prepared by plant extract-mediated hydrothermal synthesis. Powder X-ray diffraction analysis and Fourier-transform infrared spectroscopy were used to establish the phase composition and structure of the films. The photocatalytic activity of the obtained nanocomposite films was tested and compared in the reaction of degradation of Malachite Green dye under UV illumination. The photocatalytic results revealed that the PLA/PVP-containing Hydrozincite nanocomposite film leads to a higher degree of degradation of the Malachite Green dye (87 %) after 150 minutes in comparison to that of PLA/Hydrozincite (31%). The antibacterial activity of the prepared nanocomposite films against an *Escherichia coli* control strain was also discussed. The investigated biocomposite films demonstrated high antibacterial efficiency. It was found that the concentration of viable bacterial cells decreases by about 99% after 1 hour of contact time for both investigated composites.

Нанокмпозитни филми на базата на биоразградима полимлечна киселина (PLA) и PLA/поливинилпиролidon (PVP) с вграден стабилизирани хидроцинцит прах бяха синтезирани чрез метод на леење в разтвор. Хидроцинцитът беше приготвен чрез хидротермален синтез, медиран от растителен екстракт. За установяване на фазовия състав и структура на филмите бяха използвани прахов рентгеноструктурен анализ и Фурие-трансформационна инфрачервена спектроскопия. Фотокаталитичната активност на получените нанокмпозитни филми беше тествана и сравнена в реакцията на разграждане на малахитово зелено багрило при осветяване с UV. Фотокаталитичните резултати показаха, че съдържащият PLA/PVP хидроцинцит нанокмпозитен филм води до по-висока степен на разграждане на малахитово зелено багрило (87%) след 150 минути в сравнение с тази на PLA/хидроцинцит (31%). Обсъдена е и антибактериалната активност на приготвените нанокмпозитни филми срещу контролен шам на *Escherichia coli*. Изследваните биокомполитни филми демонстрираха висока антибактериална ефективност. Установено е, че концентрацията на жизнеспособни бактериални клетки намалява с около 99% след 1 час време на контакт и за двата изследвани композита.

26. Dimova S., Zaharieva K., Stoyanova D., Stambolova I., **Hubenov V.**, Eneva R., Shipochka M., Grancharov G., Dimitrov O., Ublekov F., Penchev H. New emulsion electrospun biodegradable fibers and films PLA/PVP, containing green synthesized hydrozincite – Antibacterial and photocatalytic activity. *Materials Letters*, 346, DOI:<https://doi.org/10.1016/j.matlet.2023.134554>, SJR (Scopus):0.62, JCR-IF (Web of Science):3.574

New Poly(lactic acid)/Polyvinylpyrrolidone, containing green synthesized Hydrozincite (GHZ) emulsion electrospun fibers and drop spread films possessing antibacterial and photocatalytic activity were prepared. The PLA/PVP/GHZ films possess higher photocatalytic efficiency towards Malachite Green (MG) dye discoloration (85%) than that of the fibers (62%). The films demonstrate better antibacterial activity to *E. coli* K-12 with about 6.58 Log CFU/ml in comparison with fibers which expressed about 2.20 Log CFU/ml reduction for 120 h contact.

Изготвени са нови електропредени влакна от поли(млечна киселина)/поливинилпиролон, съдържащи зелено синтезирана хидрозинцитна (GHZ) емулсия, и филми с капково разпръскване, притежаващи антибактериална и фотокаталитична активност. PLA/PVP/GHZ филмите притежават по-висока фотокаталитична ефективност срещу обезцветяване с малахитово зелено (MG) (85%) в сравнение с влакната (62%). Филмите показват по-добра антибактериална активност към *E. coli* K-12 с около 6,58 Log CFU/ml в сравнение с влакна, които показват намаление от около 2,20 Log CFU/ml за 120 часа контакт.

27. Dimitrova, L., Ilieva, Y., Gouliamova, D., Kussovski, V., Hubenov, V., Georgiev, Y., Bratanova, T., Kaleva, M., Zaharieva, M. M., & Najdenski, H. (2025). Isolation, Enrichment and Analysis of Aerobic, Anaerobic, Pathogen-Free and Non-Resistant Cellulose-Degrading Microbial Populations from Methanogenic Bioreactor. *Genes*, 16(5), 551. <https://doi.org/10.3390/genes16050551>

Abstract: Background: Nowadays, the microbial degradation of cellulose represents a new perspective for reducing cellulose waste from industry and households and at the same time obtaining energy sources. Methods: We isolated and enriched two aerobic (at 37 °C and 50 °C) and one anaerobic microbial consortium from an anaerobic bioreactor or biogas production by continuous subculturing on peptone cellulose solution (PCS) medium supplemented with 0.3% treated or untreated Whatman filter paper under static conditions. Samples were taken every 7 days until day 21 to determine the percentage of cellulose biodegradation. We determined the antimicrobial resistance of aerobic and anaerobic consortia and some single colonies by disc diffusion method, against 42 clinically applied antibiotics. PCR analyses were performed to search for the presence of eight genes for cellulolytic activity and nine genes for antibiotic resistance. By metagenomics analysis, the bacterial and fungal genus distributions in the studied populations were determined. Results: Aerobes cultured at 50 °C degraded cellulose to the greatest extent (47%), followed by anaerobes (24–38%) and aerobes (8%) cultured at 37 °C. The bacterial sequence analysis showed that the dominant phyla are *Bacillota* and *Bacteroidetes* and genera—*Paraclostridium*, *Deffluvitalea*, *Anaerobacillus*, *Acetivibrio*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus*, *Romboutsia*, *Terrisporobacter*, *Clostridium*, *Sporanaerobacter*, *Lentimicrobium*, etc. in a different ratio depending on the cultivation conditions and the stage of the process. Some of these representatives are cellulolytic and hemicellulolytic microorganisms. We performed lyophilization and proved that it is suitable for long-term storage of the most active consortium, which degrades even after the 10th re-inoculation for a

period of one year. We proved the presence of *ssrA*, *ssrA BS* and *blaTEM* genes. Conclusions: Our findings demonstrated the potential utility of the microbial consortium of anaerobes in the degradation of waste lignocellulose biomass.

Резюме: Предистория: В днешно време микробното разграждане на целулозата представлява нова перспектива за намаляване на целулозните отпадъци от промишлеността и домакинствата и същевременно за получаване на енергийни източници. Методи: Изолирахме и обогатихме два аеробни (при 37 °C и 50 °C) и един анаеробен микробен консорциум от анаеробен биореактор за производство на биогаз чрез непрекъснато субкултивиране върху пептоново-целулозен разтвор (PCS), допълнен с 0,3% третирана или необработена филтърна хартия Whatman при статични условия. Бяха вземани проби на всеки 7 дни до 21-ия ден, за да се определи процентът на биодеградация на целулозата. Определихме антимицробната резистентност на аеробни и анаеробни консорциуми и някои единични колонии чрез дисково-дифузионен метод спрямо 42 клинично прилагани антибиотика. PCR анализи бяха извършени за търсене на наличието на осем гена за целулолитична активност и девет гена за антибиотична резистентност. Чрез метагеномен анализ бяха определени разпределенията на бактериалните и гъбичните родове в изследваните популации. Резултати: Аеробите, култивирани при 50 °C, разграждат целулозата в най-голяма степен (47%), следвани от анаеробите (24–38%) и аеробите (8%), култивирани при 37 °C. Анализът на бактериалната последователност показва, че доминиращите типове са *Bacillota* и *Bacteroidetes*, а родовете - *Paraclostridium*, *Deffluvitalea*, *Anaerobacillus*, *Acetivibrio*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus*, *Romboutsia*, *Terrisporobacter*, *Clostridium*, *Sporanaerobacter*, *Lentimicrobium* и др. в различно съотношение в зависимост от условията на култивиране и етапа на процеса. Някои от тези представители са целулолитични и хемичелулолитични микроорганизми. Извършихме лиофилизация и доказахме, че е подходяща за дългосрочно съхранение на най-активния консорциум, който се разгражда дори след 10-то последователно инокулиране за период от една година. Доказахме наличието на гените *ssrA*, *ssrA BS* и *blaTEM*. Заключение: Нашите резултати демонстрираха потенциалната полезност на микробния консорциум от анаероби при разграждането на отпадъчна лигноцелулозна биомаса.