

РАЗШИРЕНА ХАБИЛИТАЦИОННА СПРАВКА
(анотация на материалите по чл. 65(1) от ПРАСПУ)

на доц. д-р Соня Костадинова Трифонова
катедра „Биохимия и микробиология“

за участие в конкурс за академичната длъжност „професор“ по област на
висше образование 4. Природни науки, математика и информатика,
професионално направление 4.3 Биологически науки (Микробиология),
обявен в ДВ бр.40/14.05.2021 г.

За участие в конкурса за академичната длъжност „професор“ представям 36 научни публикации, които не са използвани за придобиване на ОНС „доктор“ и академичните длъжности „главен асистент“ и „доцент“. Научните трудове са разпределени както следва:

- 18 публикации в издания с импакт-фактор или импакт-ранг, които са реферирани и индексирани в базите данни с научна информация - Web of Science и Scopus;
- 12 публикации в реферирани издания без импакт фактор или импакт ранг;
- 3 публикации в сборници от научни конференции с научно рецензиране;
- 2 учебника (1 самостоятелен и 1 – в съавторство);
- 1 ръководство (в съавторство).

Научните приноси могат да бъдат систематизирани в следните основни направления:

I. Микробни ензими.

II. Фактори на вирулентност при микроорганизмите.

III. Екология на микроорганизмите.

IV. Приноси към учебната дейност.

I. Приноси в областта на микробните ензими:

- определяне на активността на хидролитични ензими при Грам-положителни и Грам-отрицателни бактерии;
- оптимизация на културалните условия за продукция на ензимите от щам-продуцентите;
- изолиране и пречистване на ензимите;
- определяне на ензимни и молекулни свойства на пречистените протеини.

Микроорганизмите продуцират различни ензими, които им дават възможност да усвояват разнообразни субстрати, да колонизират жизнено пространство и това допринася за повсеместното им разпространение в средата. Ензимите са биологични катализатори, които могат да провеждат различни реакции при физиологични условия в клетките, без голям разход на енергия. Използването им в индустриални процеси гарантира намалено количество на употребявани токсични вещества, висока селективност на осъществяваните реакции, улеснено пречистване на получените продукти, намаляване на технологичните етапи, по-високо качество на крайния продукт и по-слабо замърсяване на средата. Все повече производствени процеси заменят химико-технологични етапи с биотехнологични. Някои от тези сфери са производство на храни, фуражи, перилни и почистващи препарати, текстил, фармацевтични продукти, козметика и фина химия.

Бактериите се явяват отлични продуценти на редица извънклетъчни, хидролитични ензими, поради лесното култивиране, кратките жизнени цикли и възможността да се изолират и пречистят ензимите чрез конвенционални методи. Сред бактериалните продуценти се отличават видовете от род *Bacillus*, които могат да синтезират над 40 различни ензима, част от които намират приложение в различни индустриални процеси. Микроорганизмите като цяло са предпочитани продуценти на ензими пред растителните и животински източници, тъй като производството на микробни протеини е по-евтино, по-лесно контролируемо и надеждно.

Монографичният труд „Фосфолипази С, продуцирани от видове *Bacillus*” (Публикация III. 1.) представя собствени резултати и обобщения върху продукцията и пречистването на фосфолипази С от видове *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis* и *B. sphaericus*, и ги сравнява с научните достижения в тази област.

Фосфолипазите са хетерогенна група ензими, които хидролизират ацилестерните и фосфоестерните връзки на фосфолипидите и имат разнообразни функции – катаболитна (осигуряване на субстрати за растежа), структурна (поддържане и ремоделиране на мембраните), регулаторна (формиране на биоактивни липидни молекули, участващи в сигналната трансдукция). Фосфолипазите тип С хидролизират естерната връзка между диацилглицерола и заместената фосфорна киселина в молекулата на фосфолипидите или тази между N-ацилфингозина и холин-естерифицираната фосфорна киселина. Някои бактериални фосфолипази С са фактори на патогенност, тъй като са активен компонент на бактериалните токсини, но също така допринасят за колонизацията на тъканите, прогресирането на инфекцията и подтискане на имунния отгово и др... Идентифицирането на тези ензими има голямо значение т.к. разработването на инхибитори за действието им може да генерира потенциални ваксини и терапевтични агенти, което ще намали въздействието на свързаните с тях заболявания при животни и хора.

Фосфолипазните ензими са основни медиатори на вътреклетъчната и междуклетъчна сигнализация. При хидролизата на фосфолипидите се генерират биоактивни молекули, като диацилглицерол, фосфатидна, лизофосфатидна и арахидонова киселини, които участват в редица физиологични и патофизиологични

процеси, като мембранный транспорт, клетъчната пролиферация, сигналната трансдукция и апоптичното увреждане на клетките.

Взаимодействието на фосфолипазите с мембранните фосфолипиди може да се използва и за изучаване на фосфолипидния състав на мембраните или напълно наподобяване действието на еукариотните фосфолипази С върху клетъчния метаболизъм. Тъй като до момента не са пречистени или клонирани еукариотни фосфолипаза С, видовете от род *Bacillus*, и по-специално *B. cereus* е предпочитания продуцент и предполагаем модел за действието на фосфолипазите С на бозайници.

Представените в монографичния труд резултати могат да бъдат систематизирани според фосфолипазните активности на различните видове *Bacillus*.

Щамовете *B. cereus* синтезират и трите вида фосфолипази тип С – фосфадилхолин-специфична (PC-PLC), фосфатидилинозитол-специфична (PI-PLC) и сфингомиелиназа С (SMase С). Деветдесет и три процента от анализиранияте щамове продуцират PC-PLC, 53.4% - PI-PLC и 81% - SMase С. От трите фосфолипази С ензима, най-висока е активността на фосфатидилхолин-специфичната фосфолипаза С. Активността в културалната среда при щам *B. cereus* No 51 е 16.8 U/ml, а чрез оптимизация на културалните условия е повишена с 54%. Фосфолипаза С се секретира в културалната среда в края на експоненциалната фаза на растеж - 10⁻⁸ час.

Съставена е високо-ефективна схема за пречистване на фосфолипаза С щам *B. cereus* No 51. Полученият ензимен препарат е със специфична активност 319 U/mg, а добивът по активност е 43%. Пречистената фосфолипаза С е с молекулна маса от 23-26 kDa, определени чрез гел-филтрация и SDS-PAGE електрофореза, съответно. Ензимът хидролизира фосфатидилхолин, фосфатидилетаноламин и фосфатидилсерин в този ред на активност. Не проявява активност по отношение на фосфатидилинозитол и сфингомиелин. Натриевият дезоксихолат и цетилтриметиламониевият бромид в концентрация от 0.1% стимулират хидролизата на фосфатидилхолина с 40 и 20%, съответно. Фосфолипазната активност се стимулира от Zn²⁺ и Ca²⁺ йони в концентрация от 5 mM, със 60 и 35%, съответно. Инактивируваният след инкубация с EDTA ензим се реактивира напълно от Zn²⁺ йони, и частично от Mg²⁺ и Mn²⁺, което показва, че ензимът принадлежи към Zn-металофосфолипазите.

Оптимална рН стойност за хидролизата на фосфатидилхолин е 7.2. Фосфолипаза С от щам *B. cereus* No 51 проявява много добра стабилност в рН интервала 6.0-8.0. Температурният оптимум за действие на ензима е 35-37°C. Третирането при температури от 50 и 60°C, съответно, за 30 min, води до загуба на около 50% от активността, но в присъствие на високи концентрации урея, ензимът запазва активност при по-високи температури.

Щамовете от вида *B. cereus* синтезират освен фосфатидилхолин-специфична и фосфатидилинозитол-специфична фосфолипаза С, но липсва корелация в продукцията на двата ензима. Щам *B. cereus* No 93 е селектиран като продуцент на ензима, който се секретира в средата в края на експоненциалната фаза на растеж – 8⁻⁸ час. PI-PLC е пречистена от културалната среда 1080 пъти, с добив по активност от 32% чрез четиристепенна схема, включваща ултрафилтрация, преципитация с изопропанол, йонообменна хроматография и гел-филтрация.

Пречистената PI-PLC е с молекулна маса от 27 ± 1 kDa и проявява висока специфичност по отношение на фосфатидилинозитол. Ензимната хидролиза е максимална при температура $35-40^{\circ}\text{C}$ и при рН 7.0-7.5. Ензимът не съдържа и не се нуждае от метални йони за активността си. Хидролизата на фосфатидилинозитола се стимулира от анионни (Na-дезоксихолат) и нейонни (Triton x 100) детергенти. PI-PLC запазва висока активност в рН интервала 6.0–8.0, а анализът на термостабилността показва, че температури над 60°C водят до драстична загуба на активност.

Продукция на сфингомиелиназа С е установена само при вида *B. cereus*. Налице е корелация между фосфолипазната и сфингомиелиназната активност на културите. Като продуцент на SMase С е селектиран щам *B. cereus* No 79, който секретира ензима в средата на стационарната фаза на растеж – $16^{\text{я}}$ час. Максимумът на сфингомиелиназната продукция изостава от този на PC-PLC, което е добра предпоставка за разделянето на двете активности. Сфингомиелиназа С е пречистена 238 пъти, с добив от 31% чрез комбинация от ултрафилтрация и хроматография на DEAE-cellulose и Sephadex G-75, съответно.

Молекулната маса на ензима, определена чрез гел-филтрация е 24 ± 1 kDa. Хидролизата на сфингомиелина е максимална при рН 6.5-7.0. Сфингомиелиназната активност се стимулира от Mg^{2+} йони; ефектът на Ca^{2+} йони зависи от физичното състояние на субстрата. Ензимната активност се инхибира напълно от 0.25 mM EDTA; инактивираният ензим се реактивира от Mg^{2+} йони. Хидролизата на сфингомиелина се стимулира от натриев дезоксихолат и Triton x 100. Анализът на хемолитичната активност на фосфолипаза С спрямо овчи еритроцити, показва зависимост на адсорбцията и хемолизата от присъствието на Ca^{2+} и Mg^{2+} йони.

Щамовете от вида *Bacillus thuringiensis* проявяват фосфатидилхолин-хидролизираща и фосфатидилинозитол-специфична фосфолипазна С активност. Осемдесет и шест процента от анализирани култури от този вид продуцират фосфатидилхолин-специфична фосфолипаза С, която при щам *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* 17 достига 19 U/ml в края на експоненциалната фаза на растеж – $8^{\text{я}}$ час. Активността се запазва сравнително висока за период от 6 часа, което улеснява изолирането на ензима. Проведената оптимизация на състава на средата чрез вариране на източника на азот, добавянето на метални йони и захари повишава изходната активност с 58%. PC-PLC от щам *B. thuringiensis* 17 е пречистена чрез комбинация от ултрафилтрация, гел-филтрация и FPLC (HiPrep DEAE) хроматография. Получен е хомогенен ензимен препарат със специфична активност от 190 U/mg.

Фосфолипаза С от *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* 17 е с молекулна маса 25-30 kDa, определени с гел-филтрация и SDS-PAGE електрофореза. Хидролизира фосфолипиди в следния ред: фосфатидилхолин > фосфатидилетаноламин > фосфатидилсерин. Ензимът проявява максимална активност при рН 7.0 и температура $35-37^{\circ}\text{C}$. Хидролизата на фосфатидилхолина се стимулира от метални йони - Zn^{2+} и Ca^{2+} в концентрации от 1 и 5 mM, съответно. След инактивация с EDTA, ензимната активност се възстановява напълно от Zn^{2+} и частично от Mg^{2+} и Mn^{2+} йони. Фосфолипазната реакция се стимулира и от детергенти, като натриев дезоксихолат и

Triton x 100 - 42 и 18%, съответно при концентрация от 0.1%. Ензимът губи 72% от активността си при третиране на 80°C.

Генът, който кодира фосфолипаза С при щам *B. thuringiensis var. thuringiensis* 17 е изолиран и секвениран. Най-висока степен на хомология е доказана с гена от *B. cereus*, кодиращ PC-PLC.

Продукция на фосфатидилинозитол-специфична фосфолипаза С е установена при 69% от щамовете *B. thuringiensis*. Ензимът се секретира в културалната среда в края на експоненциалната фаза на растеж – 10^{-я} час. Обогащаването на средата с глюкоза и дрождев екстракт стимулира растежа на културите и ензимната продукция с до 10%.

PI-PLC от щам *B. thuringiensis var. thuringiensis* 16Н е пречистена 1051 пъти, с добив от 25%, чрез схема, включваща ултрафилтрация, преципитация с изопропанол, катионообменна хроматография и гел-филтрация.

Ензимът от щам *B. thuringiensis var. thuringiensis* 16Н е с молекулна маса от 23±1 kDa. PI-PLC проявява висока специфичност по отношение на фосфатидилинозитол и не хидролизира други фосфолипиди. K_m за фосфатидилинозитола е определена на 1.4×10^{-3} М. Оптимална рН стойност за действие на ензима е в интервала 7.0-7.5, а оптимална температура за провеждане на ензимната реакция е 35-37°C. PI-PLC от *B. thuringiensis* 16Н, подобно на ензима от щам *B. cereus* 93, не се нуждае от двувалентни метални йони (Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+}) и активността се инхибира в присъствието им, както и от NaCl и KCl в концентрации по-високи от 0.1 М. EDTA и о-фенантролин в концентрации от 0.25 и 0.5 mM не инхибират ензимната активност. Анионният детергент - натриев дезоксихолат и нейонният - Triton x 100 стимулират ензимната хидролиза в концентрации от 0.2 до 0.8%, а цитилтриметиламониевият бромид не оказва влияние. Пречистената PI-PLC от *B. thuringiensis* 16Н проявява ектоензим-освобождаващата активност.

За първи път е доказана продукцията на фосфатидилинозитол-специфична фосфолипаза С при щамове *B. sphaericus*. Ензимът се секретира в културалната среда в началото на стационарната фаза на растеж – 12^{-я} час и активността му е съпоставима с тази на щамовете *B. thuringiensis*. PI-PLC е частично пречистена (202 пъти), с добив по активност от 26% и е освободена от съпътстваща липазна активност. Приблизителната молекулна маса, определена чрез гел-филтрация е 34±1.5 kDa. Оптимална рН стойност за действие на ензима, който проявява висока специфичност по отношение на фосфатидилинозитол е 7.2-7.5.

Проведените от нас изследвания и получените резултати потвърждават, че видовете *B. cereus* и *B. thuringiensis* са сред най-добрите бактериални продуценти на фосфолипаза С. От щамове *Bacillus cereus* могат да се изолират и трите вида фосфолипази С – PC-PLC, PI-PLC и SMase С. В нашите изследвания е доказана много висока фосфолипазна продукция и при вида *B. thuringiensis*. Видовете *B. cereus* и *B. thuringiensis* имат и други предимства, като висока активност на ензимите, ранна фаза на продукцията, което съкращава времето на култивиране, сравнително висока устойчивост на ензимите към промените в културалната среда, които предоставят добра перспектива за използването им като продуценти на ензимите.

Представените в монографичния труд резултати са оригинални и не са публикувани в периодични издания или сборници от научни форуми. Цитираните собствени публикации не са представени като материали за рецензиране в настоящия конкурс.

В **Публикация III. 2.16.** е представена детайлна информация за оптимизацията на културалните условия за синтеза на фосфолипаза С при щам *B. thuringiensis* 17, като се коментират възможностите за приложение на ензима в процесите на биоремедиация. Въпреки, че липазите и фосфолипазите са хидролитични ензими, често синтезирани от микроорганизмите, те се прилагат успешно в индустриални биосинтетични процеси. Способността им да катализират реакции на трансестерификация може да се използва в биосинтеза на алкилови естери на мастните киселини (известни като биодизели), които са важен източник на възобновяеми горива. Друго приложение на фосфолипазните ензими с висок екологичен ефект е възможността за разграждане на отпадъци от различни производства. Щамът *B. thuringiensis* 17 е с висока изходна активност и има потенциал за индустриално приложение, който се подобрява чрез детайлизирането на културалните условията за продукцията на фосфолипаза С. Предпоставка за това е и мащабирането на процеса на ензимната продукция в биореактор.

Освен фосфолипаза С, видовете *Bacillus* продуцират и редица други ензими. Проучена е активността на ензима алкална фосфатаза при *Bacillus cereus* и е установена продукция на екстрацелуларна (АР I) и мембранно-свързаната (АР II) алкална фосфатаза (**Публикация III. 2.2.**). Ензимът се синтезира на модифицирана среда с ниско съдържание на фосфати; максимална активност се отчита в средата на стационарната фаза на растеж, когато за извънклетъчната алкална фосфатаза е отчетена стойност 0.31 U/mg протеин, а за мембранно-свързаната - 1.4 U/mg. Екстрацелуларният (АР I) и мембранно-свързаният (АР II) ензими са пречистени 282 и 70 пъти, съответно, чрез комбинация от хроматографски методи. Ензимната активност е максимална при рН 9.5; инхибира се от EDTA и се реактивира от Ca^{2+} йони. Активността на ензима се инхибира напълно при третиране на 80°C. Молекулната маса, определена чрез гел-филтрация е 43 ± 1 kDa за АР I и за 44 ± 1 kDa – за АР II. Независимо от отчетените известни различия в поведението на ензимите, свойствата им са сходни, което предполага освобождаване на част от ензима в културалната среда.

Ензимът алкална фосфатаза е установен в широк спектър от организми, включително бактерии (*Escherichia coli*, *Bacillus spp.*, *Mycobacterium smegmatis*, *Thermotoga maritime*, *Haloarcula marismortui*), както и при човек. Счита, че функцията на ензима е в освобождаването на фосфатни групи, необходими за растежа на бактериите, което се подкрепя от факта, че видовете *Bacillus* синтезират ензима при култивиране на среда с ниско съдържание на фосфати.

Активността на ензима алкална фосфатаза е анализирана и при щамове, изолирани от почва и идентифицирани като *E. coli*, на базата на биохимични, морфологични и културални признаци (**Публикация III. 3.2.**). Всички щамове продуцират мембранно-свързани алкална фосфатаза и β -галактозидаза. Три от изолатите показват висока изходна активност (между 10 и 20 U/ml), и при тях е

проследена динамиката на ензимния синтез. Алкалната фосфатаза се продуцира в късна стационарна фаза (24^{-я} час), като след достигнатия пик се запазва плато на сравнително висока активност до 48^{-я} час. Ензимът на *E. coli* е първата открита и охарактеризирана бактериална алкална фосфатаза. Този ензим има широко приложение при идентификацията на секретирани и интегрални белтъци, в качеството на експортен протеин; за анализ на мембранната топология и при откриване на инсерционни-толерантни сайтове в мембранните протеини, което обуславя интереса към изолиране на щамове с висока фосфатазна активност и възможността да бъдат използвани като ефективни продуценти на ензима.

Видовете *Bacillus* са сред най-перспективните продуценти на протеолитични ензими (алкални и неутрални протеази), които имат висока активност, широк рН спектър на действие, температурна стабилност и устойчивост към органични разтворители. Тези ензими намират приложение при производството на биоактивни пептиди, в органични синтетични реакции, влагат се в детергенти, в кожарската, хранително-вкусовата индустрии. При анализа на протеолитичната активност на 166 щамове от род *Bacillus* (**Публикация II. 2.10.**) е доказана активност при 90% от тях. Активността варира в широки граници, но при пет щамове са установени високи стойности, от порядъка на 8-9 U/ml. Щам *B. thuringiensis* 14 е селектиран като високо-активен продуцент на ензима и с него са проведени изследвания за оптимизиране на културалните условия (състав на средата, буферизираща система, тип на инокулацията) и установяване на динамиката на ензимната продукция. Замяната на карбонатната буферизираща система с фосфатен буфер поддържа необходимото рН за протеазната продукция, като същевременно не инхибира ензимната активност, а добавянето на Mg²⁺ йони стимулира ензимната продукция. Екстрацелуларната протеазна активност в края на експоненциалната фаза на растеж достига 15 U/ml. Осъществено е частично пречистване на ензима чрез ултрафилтрация и Sephadex G-75 хроматография. Гел-филтрационният профил показва три пика на протеолитична активност, а SDS-електрофорезата на активните фракции - два протеина с приблизителна молекулна маса от 45 и 63 kDa.

Щамове от род *Bacillus* са анализирани и за извънклетъчна амилолитична активност (**Публикация III. 3.9.**), която е установена при 31% от културите – 61% от изследваните *B. cereus*, 31% *B. thuringiensis*, 3% *B. sphaericus*. Активността варира от 0.9 до 2.8 U/ml и е най-висока при щам *B. cereus* No 10. Ензимът започва да се секретира в културалната среда в експоненциална фаза (8^{-я} час/1 U/ml), но достига максимум в късна стационарна фаза - 36^{-я} час/3.14 U/ml. Продължителната ензимна продукция по време на растежния цикъл и наличието на три плато на активност, предполага синтез на различни амилазни ензими, които се освобождават в хранителната среда по време на растежа на *B. cereus*. Секрецията на ензима в средата не е свързана с лизис на клетките, вследствие на споробразуване. Обогащването на средата с 0.1% рибоза или глюкоза, съответно, дрождев екстракт и Ca²⁺ йони стимулира амилазната активност на щам-продуцента.

Амилазите имат голямо индустриално приложение, формирайки повече от 25% от световния пазар на ензими. Амилазите, продуцирани от *Bacillus* се използват широко в

различни индустрии – в хранителната, за получаване на глюкоза и глюкозо-фруктозни царевични сиропи, захарификация на нишесте, приготвяне на различни алкохолни напитки, хидролиза на нишестето в тестото до декстрини, ди- и монозахариди, които се усвояват от дрождите; в текстилната промишленост - за оразмеряване без увреждане на текстилните влакна; влагат се в детергенти. Разнообразните приложения на амилолитичните ензими увеличава необходимостта от откриване на нови продуценти и ензими със специфични свойства.

Сред Грам-отрицателните бактерии, видовете на род *Pseudomonas* се отличават с активна извънклетъчна ензимна продукция. Представителите на този род синтезират различни, някои от които уникални ензими, които им дават възможност да усвояват разнообразни субстрати – въглехидрати, липиди (органични киселини), белтъци (аминокиселини), ароматни и алифатни въглеводороди. Продуктивният метаболизъм на съединенията, дефинирани като ксенобиотици от тези бактерии ги прави незаменими в процесите на биотрансформация и биоремедиация. В Публикация Ш. 3.5. е анализирана и доказана положителна липазна и фосфолипазна С активност на щамове *P. fluorescens*, *P. putida* и *Pseudomonas sp.*. Фосфолипазната активност е най-висока при щамовете *P. fluorescens*, с максимум на секрецията на 12^{-я} час (начало на стационарната фаза на растеж). Продукцията на ензима се стимулира от добавянето към соево-казеиновата среда на допълнителни източници на въглерод и енергия, като ксилоза и арабиноза, съответно, при щам *P. fluorescens* 5В и от ксилоза, арабиноза и рамноза, съответно, при щам *P. fluorescens* 1D. Същите щамове продуцират и липаза, чиято активност достига 2.1 и 1.4 U/ml на оптимизираната среда с добавена ксилоза. Висока липазна активност е отчетена и при щам *Pseudomonas sp.* 1442, при който липсва корелация в синтеза на двата липолитични ензима. Максимумът на липазната секреция в средата е отчетен на 20^{-я} час и след този на фосфолипазната, което е свързано с ролята на ензимите в осигуряването на субстрати за микробния растеж. Сравнително високата активност (за Грам-отрицателни бактерии) привлича особено внимание към специфични класове ензими от род *Pseudomonas*. Липазите *P. aeruginosa*, *P. cepacia* и *P. fluorescens* са получени в промишлени условия и се използват при органичния синтез, включително при катализа на реакциите във водни разтвори.

II. Приноси в областта на микробната патогенеза:

- **идентификация на микроорганизми, асоциирани с инфекции на урогениталния тракт (ентеробактерии, *Enterococcus*, *Candida*);**
- **определяне на фактори на вирулентност и патогенност при микроорганизмите и корелация между тях;**
- **изясняване на механизмите на микробната патогенеза.**

В Публикация Ш. 1. се коментира значението на фосфолипазите С като фактори на вирулентност и патогенност при някои патогенни и условно-патогенни микроорганизми – *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *B. cereus* и др.. Разгледани са ефектите от взаимодействието на фосфолипазету с мембранните фосфолипиди и различните аспекти на участието на фосфолипазите в инфекциозния процес. Особено значение в

микробната патогенеза има способността на сфингомиелиназа С да лизира еритроцити от различни видове, което е в пряка корелация със съдържанието на сфингомиелин в мембраните им. Продуцираната от бактериите фосфатидилинозитол-специфична фосфолипаза С също допринася за „преживяването“ и разпространението на бактериите по време на инфекциозния процес, но освен това в резултат на действието ѝ се формират сигнални молекули (second messengers), като протеинкиназа С и инозитол трифосфат, които активират каскадни ензимни реакции с решаващо значение в редица физиологични и патофизиологични процеси.

Приносите в областта на микробната патогенеза са свързани главно с идентификация на бактерии, изолирани от пациенти с инфекции на урогениталния тракт, определяне на вирулентните детерминанти, установяване на лекарствената им устойчивост, което е необходимо както за прилагане на подходяща терапия, така и за откриване на нови подходи при лечение на инфекциите. Обърнато е особено внимание на способността на бактериите да формират биофилми, като една от ключовите стратегии за „оцеляване“ в условията на гостоприемника и факторите, които могат да го модулират.

Инфекциите на уринарния тракт (UTI) са най-често диагностицираните инфекции при човек и представляват сериозен здравен и икономически проблем за обществото. Лечението на тези заболявания е свързано с коректната идентификация на причинителите, установяване на вирулентните детерминанти и резистентността им спрямо антимикробни вещества. Установяването на лекарствената устойчивост на микроорганизмите е от основно значение при избора на подходяща терапия, но също така е наложително поради способността на микроорганизмите да придобиват резистентност чрез различни механизми. Нарастващата резистентност на микроорганизмите се явява световен екологичен проблем и налага търсенето на алтернативни подходи за лечение на причиняваните инфекции.

Изследването на 318 щамове ентеробактерии, свързани с инфекции на урогениталния тракт потвърждава, че най-често срещаният етиологичен агент е *Escherichia coli* (64.8%), следван от *Klebsiella spp.* (17%) и *Proteus mirabilis* (10.37%) (**Публикация III. 3.10.**). Анализиранието на антибиотичната резистентност показва висока устойчивост към ампицилин (49%), мецилинам (71%), доксицилин (41%) и чувствителност към цефалоспорини (цефуроксим 84.6%; цефокситин 83.7%; цефотаксим 91.5%; цефепим 87.7%) и флуорохинолони (ципрофлоксацин 85%, норфлоксацин 79%, левофлоксацин 83%). Установена е значителна резистентност към нитрофурантоин (24%). От тестваните щамове 8.5% произвеждат широко-спектърни β -лактамази (ESBLs). Осемдесет и четири процента от щамове са резистентни към бактерицидната активност на нормалния човешки серум. Резултатите показват, че вероятно резистентността към комплемента е един от задължителните фактори на вирулентност за по-голямата част от ентеробактериите, свързани с урогенитални инфекции.

В **Публикация III. 3.7.** са представени резултатите от изследването на вирулентните детерминанти на двадесет щамове *Escherichia coli*, изолирани от урината на

пациенти с различни инфекции на пикочните пътища, асимптоматична бактериурия и бременни жени. Вирулентните детерминанти, които участват началния етап и установяването на инфекциите като адхезини, подвижност, хемолизини, серумна резистентност и образуване на биофилм са изследвани фенотипно и с мултиплекс PCR. Щамовете експресират различни фактори на вирулентност, като статистически най-често срещаната структура е тип 1 пили, установена при 75% от изолатите.

Резултатите от изследването на чувствителността на 28 клинично изолирани щамове *E. coli*, асоциирани с инфекции на пикочните пътища към β -лактамни и аминокликозидни антибиотици и сулфонамиди са представени в **Публикация III. 2.1**. Най-ниска чувствителност е установена по отношение на β -лактамни антибиотици (ампицилин и ампицилин/сулбактам), а относително висока към аминокликозидни антибиотици (гентамицин и амикацин). Най-голяма чувствителност е регистрирана към нитрофурантоин и цефотаксим/клавуланова киселина. Приблизително половината от изследваните щамове са мултирезистентни, а шест от тях синтезират широко спектърни β -лактамази (ESBL). Анализирани са плазмидния профил на изолатите и се обсъжда участието им в лекарствената резистентност.

Като част от тематиката за доказване на вирулентните детерминанти на щамове, асоциирани с инфекции на уринарния тракт е анализиран биофилм формирация капацитет на 50 щамове *E. coli*, изолирани от пациенти с различни симптоми на уринарни инфекции – цистит, пиелонефрит, простатит (**Публикация III. 2.3**). Формирането на биофилм е установено при 36% от изолатите, а 24% продуцират α -хемолизин. Липсва връзка между образуването на биофилм и продукцията на хемолизин. Установено е относително ниско присъствие (16%) на фимбрии тип 1, докато 23 (46%) от щамовете показват MRNA активност, която може да бъде медирана от P фимбрии, X, FIC и DR фимбрии. Фимбриите тип 1, които улесняват адхезията към епителните клетки на гостоприемниците, са важни в началните етапи на образуване на биофилм и е възможно след успешна колонизация и преход към коменсализъм, щамовете да са „загубили“ някои фактори на вирулентност. Изследваните изолати показват относително висока устойчивост срещу тестваните антибиотици - 19 (38%) щамове са с полирезистентен фенотип, а 8 (16%) щамове продуцират ESBL (широко спектърни β -лактамази). Оценката на връзката между биофилм-формирането и другите фактори на вирулентност като, антибиотична резистентност, наличие на хемолизини и морфотипът на изследваните щамове, показва, че образуването на биофилм не е пряко свързано с другите вирулентни детерминанти.

Бактериите, формиращи биофилм, причиняват сериозни проблеми в медицинската практика чрез замърсяване за повърхности, медицински консумативи (катетри, импланти) и като източник на вътреболнични инфекции. Биофилм-образуващите микроорганизми развиват антибиотична резистентност по-бързо от планктона и това налага търсенето на алтернативни стратегии за потискане на биофилм-формирането. Една от тях включва откриване на средства за потискане на растежа на биофилма, без да се убиват самите микроорганизми, за да се избегне развитието на резистентност.

В **Публикация III. 2.4.** са представени резултатите от ефекта на екстракти от медицински значими растения (*Rhodiola rosea*, *Arnica montana*, *Petasites albus*, *Petasites hybridus*) върху биофилм формирания капацитет на три клинични изолата *E. coli* - два уропатогенни (UPEC), всеки от които е резистентен към два антибиотика, и един от асимптоматична бактериурия (ABU), който е мултирезистентен. Диск-дифузионният анализ показва липса на антибактериална активност на 14 различни екстракта от растенията. Всички екстракти модулират растежа на биофилма, а четири от тях значително потискат биофилм-формирането на UPEC щамове, но стимулират свързания растеж на ABU щама. Същевременно, екстрактите не влияят съществено върху кривите на растеж на UPEC щамове, но забавят растежа от ABU щама. Регистрираните противоположни ефекти върху патогенните и непатогенни щамове от растителните екстракти (Rr₁, Rr₂, Am₁ и Am₂) потвърждават добрия потенциал за приложение в медицинската практика.

Взаимоотношенията между отделните видове в биофилма може да окажат ефект върху тяхната физиология. Способността на коменсални пробиотични бактерии, напр. *Lactobacillus* да влияят върху капацитета на патогените за колонизация на гостоприемника и експресията на вирулентни фактори може се използва като алтернативен подход за поддържащи медицински приложения. В изследването, представено в **Публикация III. 2.5.** са анализирани ефектите на разреждени супернатанти (CFS) от *Lactobacillus spp.* (изолирани от млечни продукти и вагинални изолати) върху растежа и биофилм-формирането на *E. coli*. Повечето от CFS, прилагани като 10⁻², не оказват влияние върху растежа на бактериите, но развитието на биофилма е повлияно дори от 10⁻⁴ от CFS. Модулацията на биофилма варира от инхибиране до активиране, при различните комбинации от CFS и щамове *E. coli*. Три от тестваните CFS потискат образуването на биофилм, което не се дължи на антибактериална активност, и това предполага различен механизъм на действие. В отговор на действието на CFS, се отчитат и други промени, като намаляване на хидрофобността и подвижността на щамове *E. coli*. Поради понижаване на инхибиторната активност от протеиназа K, се предполага участие на протеин или пептиден фактор (и) в потискането на биофилма.

Най-често изолирания етиологичен агент за унфекциите на уринарния тракт е *Escherichia coli*, но се установяват и други ентеробактерии, Грам-положителни бактерии (*Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus spp.*) и гъбички. Видовете *Enterococcus faecalis* и *E. faecium* са често изолирани патогени при асоциирани с катетри инфекции на пикочните пътища (CAUTI). В изследването, представено в **Публикация III. 3.11.** е анализирана лекарствената резистентност и способността за образуване на биофилм на 72 щама *Enterococcus faecalis*, изолирани от урогениталния тракт на амбулаторни пациенти. Резултатите показват, че инфекциите на пикочните пътища, причинени от ентерококи, са по-чести при деца до 10-годишна възраст, докато инфекциите на гениталния тракт (GTI) се наблюдават най-често при жени в репродуктивна възраст. Лекарствената резистентност е ниска, с по-високи нива за UTI в сравнение с GTI щамове. Отчетена е 100% чувствителност към пеницилини, които се прилагат за лечение на *E. faecalis*-инфекции. Устойчивостта към флуорохинолони е по-

малка от 19%, с ясно изразена кръстосана резистентност. Образуването на биофилм е установено за 26% от щамовете, които се категоризират като щамове с ниска степен на образуване на биофилми.

В **Публикация III. 3.12.** са представени резултатите от изследванията върху таксономията, резистентността и някои фактори на вирулентност на 97 шама *Candida*, изолирани от проби (вагинални, цервикални и уретрални секрети) от амбулаторни пациенти. Сред изолатите преобладават *C. albicans* (84%), следвани от *C. glabrata* (7%), *C. krusei* (4%), *C. parapsilosis* (3%) и *C. tropicalis* (2%). Противогъбичната резистентност е ниска и основно свързана с *C. glabrata*, а обща чувствителност на щамовете към тестваните противогъбични препарати е над 95%. Анализът на активността на хидролитичните ензими и способността за образуване на биофилм показва, че само 8% от щамовете продуцират желатиназа и фосфолипаза, 6% продуцират казеиназа и 5% - естераза. Седем от тестваните щамове образуват стабилен биофилм след 24 часа култивиране в декстрозен бульон Sabouraud, обогатен с 6% глюкоза. Не е установена значителна корелация между противогъбичната чувствителност и изследваните фактори на вирулентност при щамовете *Candida* spp.. Всички щамове, образувачи биофилми, са чувствителни към противогъбични лекарствени средства, не продуцират хидролитични ензими и имат основно характеристики на коменсали, което предполага, че е възможно гъбичната инфекция да е резултат от промяната в баланса на нормалната микробиота.

Във връзка с тематиката за нарастващата лекарствена устойчивост на микроорганизмите и търсене на алтернативи терапевтични средства, са резултатите отразени в **Публикация III. 3.4.** Анализирани за антимикробна активност спрямо седем шама микроорганизми, са новосинтезирани производни на бензимидазол. Осем от синтезираните съединения показват антимикробна активност (бактерицидна, бактериостатична и антимикотична) спрямо *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes* и *Candida albicans*.

III. Приноси в областта на екология на микроорганизмите:

- **определяне на микробиологичния статус на водни тела (язовири), влиянието на антропогенния фактор и на садковите стопанства, разположени във водоемите;**
- **установяване на микробните съобщества във влажни зони в Южна България и в басейна на река Марица; метагеномен анализ на структурата на съобществата;**
- **конструиране на биосорбенти за тежки метали, чрез имобилизация на отпадна бактериална биомаса; установяване на оптималните условия за сорбция и възможности за приложение в процесите на биоремедиация на зъмърсени води.**

Приносите в областта на микробната екология могат да бъдат определени в няколко различни направления. Едно от тях е определяне на микробиологичното състояние на два големи язовира - Доспат (**Публикация III. 2.7.**) и язовир Кърджали

(Публикация III. 3.8. и Публикация III. 3.6.). Двата язовира се използват интензивно за отглеждане на риба в садкови стопанства, като индустриална форма на аквакултура, което може да бъде причина за влошаване качеството на водата и промени в състава на микрофлората около садковите стопанства. В България липсват изследвания относно влиянието на тези акваферми върху бактериологичния статус на хидроекосистемата на водните тела, в които са разположени. Освен това, през последните десетилетия се наблюдава засилена урбанизация и развитие на крайбрежните зони, което увеличава риска от замърсяване с битови отпадни води. Това налага повишено внимание към санитарно-хигиенните параметри на качеството на водата, в това число оценка на микробиологичното замърсяване (общ брой микроорганизми) и санитарното състояние (общ брой на колиформите) на водите, използвани за аквакултура.

Проведеното микробиологично изследване на качеството на водата в язовир Кърджали (Публикация III. 3.8.) включва определяне на общите колиформи (ТС) и *coli*-титъра при две станции в акваторията на язовира и една станция в река Арда през м. август 2011 г. Стойностите на индекса на ТС в язовира варират от 1900 ± 674 cfu/100 ml в станция I, до 1293 ± 194 cfu/100 ml в станция II, докато стойността на ТС на река Арда достига 1698 ± 134 cfu/100 ml. В язовир Кърджали, *coli*-титърът варира между 5 и 15 ml, докато за река Арда стойността е равна на 1. Най-широко представени във водите на язовира са родове *Klebsiella* (70%), *Citrobacter* (15%), *Enterobacter* (10%) и *Serratia* (5%), съответно представени с видове *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae* и *Serratia marcescens*. В река Арда са открити родове *Serratia* (50%) и *Salmonella* (50%). Най-високи нива на замърсяване с отпадни води, въз основа на изследването на *coli*-титъра и *coli*-индекса (200 cfu *E. coli*/1 l) са установени във водите на река Арда в участъка, преди да се влее в язовир Кърджали. Липсата на патогенни видове, съчетана с намаляване на броя на ТС, *coli*-титъра и *coli*-индекса в станция II е доказателство за способността за самопречистване на изследваното водно тяло. Новото увеличение на броя на ТС на станция I в близост до село Главатарци, както и наличието на фекални колиформи, показва вторично място на замърсяване с канализационни води в региона.

Изследванията в тази област са продължени чрез проследяване на сезонната динамика на основни индикаторни групи (*Escherichia coli*, фекални стрептококи (FS) и *Clostridium perfringens*) във водите на язовир Кърджали в периода април - март 2011/12 г., като са взети проби от шест станции (Публикация III. 3.6.). Броят на *E. coli* и FS не надвишава съответно 30 cfu/100 ml и 20 cfu/100 ml, с изключение на м. август и октомври, през които е доказано увеличение на стойностите на индикаторите. Статистически значими разлики са установени за броя на *E. coli* и FS между станциите, разположени в езерната зона на язовира и тези в садковите ферми и село Главатарци. Наличието на *C. perfringens* е установено едва през м. август, главно на станциите, разположени в близост до фермите с мрежови клетки и в близост до язовира. Изолираните и идентифицирани общо 220 щама фекални колиформи попадат в 5 рода от семейство *Enterobacteriaceae*. Наблюдаваните микробиологични параметри показват изразена сезонна динамика в язовир Кърджали и река Арда, с пикови стойности на всички индекси през м. август. Установеният видов състав на групата на колиформите

дава основание да се предположи, че микробиологичното замърсяване се дължи главно на повишен екологичен натиск, причинен от човешка дейност в района.

В язовир Кърджали са проведени изследвания за установяване на връзката между абиотичните фактори на средата, микробиологичните показатели за качеството на водата и фитопланктона, с оглед на развитието на интензивна садкова аквакултура (**Публикация III. 2.14.**). Извършени са многофакторни анализи, базирани на данни за осемнадесет показателя от 5 мониторингови пункта, получени в периода 2016-2018 г. Целта е да се идентифицират ключови параметри, засягащи биологичните съобщества, включително въздействието на садковите стопанства. ANOSIM (анализ на сходства), показва значителни разлики в стойностите на физико-химичните фактори между контролния обект и зоната за аквакултури, с по-високи нитрати, общ азот и COD (chemical oxygen demand) в близост до мрежите. Резултатите са потвърдени от високата R-стойност ($R = 0.87$; $p < 0.01$). Проведеният PCA (принципен компонентен анализ) показва, че физико-химичните параметри могат да бъдат групирани само в три главни компонента (PC) - PC1 се формира от формите на азот и COD, PC2 отразява физическия източник на вариация (рН и разтворен кислород), а PC3 се формира от общ фосфор (0.537) и амониев азот (0.764). Трите компонента формират 90.5% от общата вариация. Параметрите с най-голямо въздействие върху обилието от хетеротрофни бактерии (TVC) включват температура, TN и COD. Фосфорът не е лимитиращ фактор, поради високата му концентрация. Проведеният многофакторен анализ (RDA) ясно показва, че в язовирите с развита интензивна садкова аквакултура дългосрочната експлоатация на стопанствата е свързана с локални промени (ограничени в близост до стопанствата) във физико-химичното качество на водата, които водят до количествени и качествени изменения във фитопланктонните и бактериалните съобщества.

Анализът на водите на яз. Доспат цели да установи микробиологичното състояние на водното тяло и да идентифицира възможни вторични източници на замърсяване в акваторията (**Публикация III. 2.7.**). За оценка на основните микробиологични показатели са избрани шест станции, разположени в акваторията на язовира, и една станция на река Доспатска. Определена е сезонната и пространствена динамика на общия брой микроорганизми (TVC 20°C), общите колиформи, *E. coli*, фекални стрептококи и *S. perfringens* за периода м. април 2011 г. – м. март 2012 г. Стойностите за TVC 20°C са в диапазона 1.10^3 cfu/100 ml до 39.10^3 cfu/100 ml, без статистически значими разлики между станциите. Стойностите за общите колиформи варират от 10 cfu/100 ml до 100 cfu/100 ml, а през м. август се повишават до 1000 cfu/100 ml, с по-високи нива в близост до стопанството. Колиформите се характеризират с ниско видово разнообразие и доминиране на *Serratia marcescens*, *Pantoea agglomerans*, *Hafnia alvei* и *Enterobacter cloacae*, които са част от естествената микрофлора на водните обекти. Анализът на TVC 20°C и общите колиформи показва изразена сезонна динамика в язовир Доспат, а водите на река Доспатска се характеризират с по-високи нива на микробно натоварване в сравнение с откритата акватория на водното тяло. Високите стойности на числеността на индикаторите в близост до гр. Сърница е показателно за заустването на фекално-битови отпадни води.

Вторичното им повишаване при садковото стопанство свидетелства за значим антропогенен натиск в зоната.

В допълнение към установеното микробиологично състояние на двата големи язовира, е направена оценка на антибиотичната резистентност на бактериални щамове, изолирани от водите под садковото стопанство в язовир Кърджали (**Публикация III. 2.6.**). Антимикробната резистентност е пряк резултат от селективния натиск, предизвикан от прекомерното използване на антибиотици, включително злоупотребата с антибиотици във ветеринарната медицина и аквакултурите. В изследването е отчетена чувствителността на 160 щамове Грам-отрицателни бактерии (100 щамове *Pseudomonas mandelii*; 30 щамове *Hafnia alvei*; и 30 щамове *Raoultella ornithinolytica*) към 16 антимикробни агента. Не са наблюдавани съществени разлики в резистентността към тестваните антибиотици между щамовете, изолирани от двете станции (анализ на дисперсията, $P > 0.05$) и същевременно се отчита висока резистентност към пеницилини и някои цефалоспорини. Няма резистентни щамове към аминогликозидите гентамицин и амикацин или към ципрофлоксацин. Определени са минималните инхибиращи концентрации (MIC) за пет от тествани антимикробни вещества. Данните показват, че амикацин, тетрациклин и ципрофлоксацин ефективно потискат растежа на тестваните микроорганизми. Изолатите от род *Pseudomonas* показват най-висока MIC и имат най-висок процент на антибиотична резистентност.

Микроорганизмите, обитаващи сладководна среда, са неразделна част от водната екосистема. Понастоящем има много малко данни относно таксономичния състав на микробните съобщества в язовирите в България, въпреки ключовата им роля в биогеохимичните процеси. В **Публикация III. 2.8.** е представен първия цялостен метагеномен анализ на планктонното бактериално съобщество на два големи и икономически важни за България язовира – язовир Батак и язовир Цанков камък. Анализът показва, че 78.45% от микробиома между двата язовира се припокрива. Индексите на разнообразието (H) и изравненост на съобществото (J) намаляват по надлъжната ос на двата язовира. Установените стойности за индексът на разнообразието на Шанън са характерни по-скоро за олиготрофните водни тела. Доминантният комплекс в двата язовира се формира от отдел *Proteobacteria*, следвани от *Actinobacteria* и *Bacteroidetes*, които съставляват над 95% от относителното обилие, независимо от големите хидрогеоложки различия. Бактериопланктонът се характеризира с висока филогенетична хетерогенност в таксономичната структура. Установено е присъствието на 211 рода. Родовете *Limnohabitans* и *Rhodospirillum rubrum* са доминиращи, което предполага тяхното значение във водните хранителни мрежи. Получените данни могат да допринесат за по-доброто разбиране на микробното разнообразие в сладководни среди и да послужат като база за бъдещи сравнения.

Друго направление, в областта на микробната екология е характеристиката на микробните съобщества във влажни зони в Южна България (**Публикация III. 2.11.**) и в басейна на река Марица (**Публикация III. 2.18.**). Влажните зони са важни екологични територии или акватории, в които микробните съобщества играят съществена роля в първичната производителност, кръговрата на хранителните вещества и пречистваенето на водата. Изградените влажни зони са евтини екологични „съоръжения“, базирани на

идеята за възможността чрез биологични методи да се отстранява антропогенното замърсяване. Влажните зони се намират в райони с ниска надморска височина и изпълняват важна роля в пречистването в близост до градските райони. Изследванията на междувидовите съобщества и техните способности да развият метаболитни мрежи и биофилми могат да бъдат полезни в процесите на биоремедиация на замърсените местообитания.

Анализирано е състоянието на микробните съобщества и способността им да образуват биофилм в две защитени от Натура 2000 влажни зони – „Злато поле“ и оризови поля Цалапица в Южна България (**Публикация III. 2.11.**). Определени са броят на хетеротрофните бактерии (TVC 22 и TVC 37), актиномицети, гъби, и санитарно-показателни микроорганизми в проби от суха почва и седименти. Броят на хетеротрофните микроорганизми и показателите за санитарен статус (FS, FC и *Escherichia coli*) в двата оризови пояса край град Пловдив са по-високи в сравнение с контролната зона „Злато поле“; максимумът е регистриран в оризовото поле край село Цалапица (C_1 и C_2 е 12.6×10^6 cfu.g-1 и 26×10^6 cfu.g-1, съответно). В изследваните проби бактериалният комплекс заема доминантна позиция и превишава броя на плесенните гъби и актиномицетите най-малко 1.5 пъти. Клъстерният анализ показва голямо сходство между почвите, около оризовите полета и седименти от Злато поле (ZP_2) поради ниското органично натоварване. Анализът на биофилм-образуването показва добра корелация между структурата на микробните съобщества и капацитета за образуване на биофилм.

Влажните зони, разположени по протежение на Българската част от басейна на река Марица са част от Рамсарската конвенция и представляват редки специфични екосистеми. В нашето проучване са изследвани пространствените различия и физиологичното разнообразие на почвените микробни съобщества в естествените влажни зони и изградени оризови полета в басейна на река Марица, защитени съгласно Директивата за птиците 2009/147/ЕО като естествени местообитания (**Публикация III. 2.18.**). Метаболитната функционалност на съобществата в изследваните влажни зони се различава значително, което доказва, че профилът им се формира от широк спектър от фактори на средата като съдържание на вода в почвата, рН, органични вещества и източници на азот. РСА и клъстерният анализ показват, че дългосрочната земеделска експлоатацията променя свойствата на почвата и бактериалните съобщества, групирайки оризовите полета в отделен клъстер. Непрекъснатото култивиране на ориз във влажните зони на Цалапица водят до подкисляване на почвата и по-висока обща метаболитна активност, но по-ниско катаболитно и субстратно разнообразие, което прави микробни съобщества чувствителни към стрес и външни фактори. По-високото субстратно разнообразие наред с песъчливите, подобни на речни седименти, ниската концентрация на органичен азот, органични вещества и фосфати, са доказателство за добрия екологичен потенциал на влажната зона „Злато поле“. Това се потвърждава и от по-високата метаболитна активност по отношение на трудно-усвоими полиоли и аминокиселини, поради отсъствието на лесно-усвоими въглехидрати.

Изследван е бактериалния микробиом в естествената влажна зона на „Злато поле“ и защитени, периодично наводнени оризови полета в басейна на река Марица

(**Публикация III. 2.15**), чрез масово паралелно секвениране (NGS). Анализът на алфа-разнообразието показва значителни вариации между трите места за проучване за Chao1 и ACE индексите. Установена е положителна корелация с рН - най-високи стойности са отчетени за оризовите полета и най-ниски за седиментите от „Злато поле“. Получените секвенции са разпределени в 37 известни бактериални отдела, като над 97% от всички секвенции се отнасят към 9 от тях. Бактериалните консорциуми в оризовите поля са доминирани от протеобактерии, последвани от актинобактерии и ацидобактерии. Съобществата в седиментите при „Злато поле“ се диференцират от тези в оризищата, като ацидобактериите са заменени от *Firmicutes* и *Bacteroidetes* и микробиомът показва изключително високо обилие на Гама-протеобактерии и *Bacillus*. Доминирането на Гама-протеобактериите и наличието на отдел *Deinococcus-Thermus*, заедно с по-ниска концентрация на хранителни вещества и липсата на корелация с параметрите на околната среда е доказателство за постоянен антропогенен натиск около района.

Настоящото изследване е първият подробен анализ на бактериалното разнообразие в две различни влажни зони в басейна на река Марица. Резултатите разкриват значителна разлика в структура на бактериалната общност между трайно наводнени наноси от влажната зона „Злато поле“ и сезонно наводнените седименти на защитената местност „Оризища Цалапица“. Мултивариационните анализи групират почвените микробиоми в басейна на река Марица въз основа на вида на почвата, типа влажна зона и извършваните в нея мелиоративни мероприятия. Получените резултати потвърждават същественото значение на факторите на средата върху структурата на микробната общност. Микробните съобщества задвижват биогеохимичните цикли във влажните зони; те подпомагат функцията на почвата и лесно се влияят от антропогенния натиск.

Актуално направление в съвременната екология е отстраняването на различни замърсители, чието присъствие в биосферата се увеличава непрекъснато вследствие на интензивния индустриален и градски растеж. Особено внимание заслужава замърсяването с метали поради тяхната токсичност и потенциал за биоакмулиране чрез хранителната верига. Биосорбцията е икономична и екологична алтернатива на конвенционалните методи за пречистване на отпадни води, които имат редица недостатъци, включително риск от генериране/получаване на опасни/токсични странични продукти. Биосорбцията е метаболитно независим процес за отстраняване на неорганични и органични вещества от разтвори, чрез биологичен материал. Като сорбент може да се използва мъртва микробна биомаса, която има предимства пред живите клетки - ниска цена, липса на хранителна среда и поддръжка, чисти микробни култури, висока скорост на сорбция и десорбция, работа в широк диапазон на рН, бърза и лесна регенерация. Свободните микробни биосорбенти са с малък размер и ниска плътност, недостатъчна механична стабилност и ниска еластичност, което причинява проблеми с металната йонна десорбция, отделяне на сорбента от средата и неговата регенерация. Обездвижването на микробната биомаса върху подходящи носители, отстранява недостатъците на свободните биосорбенти и дава повече възможности за практическо използване на биосорбцията. В **Публикация III. 2.12.** са анализирани различните техники и носители за имобилизация, определени са основни

характеристики и възможности за използване на имобилизирани микробни биосорбенти за отстраняване и концентрация на метали от водни разтвори.

Като биосорбент за отстраняване на метали от водни разтвори може да се използва биомаса от Грам-положителни (*Bacillus sp.*, *Corynebacterium sp.*) и Грам-отрицателни бактерии (*Escherichia sp.*, *Pseudomonas sp.*), цианобактерии (*Anabaena sp.*, *Synechocystis sp.*), плесени (*Aspergillus sp.*, *Rhizopus sp.*), базидиомицети (*Trichosporon sp.*, *Trametes sp.*), дрожди (*Saccharomyces sp.*, *Candida sp.*), отпадна микробна биомаса от производството на антибиотици, ензими, аминокиселини и други биотехнологични производства. В **Публикация III. 2.13.** са представени резултати от опитите за конструиране на нов композитен биосорбент за отстраняване на тежки метали от водни разтвори. За целта е имобилизирана отпадна биомаса от *Bacillus cereus* в натриев алгинат и съвместно имобилизирана с активен въглен или с бентонит в алгинатен гел. Композитният биосорбент е изследван за отстраняване на Pb (II), Cd (II) и Hg (II) от водни разтвори. Най-перспективен се оказва сорбентът, състоящ се от отпадна биомаса на *B. cereus*, имобилизиран с активен въглен в алгинатни перли. Имобилизацията увеличава както капацитета за отстраняване, така и механична устойчивост на биосорбента. Най-висок е афинитетът към йони на Pb (II), последвани от Cd (II) и Hg (II). Основните параметри на процеса са оптимизирани и максимална ефективност за отстраняване (от 92.13%) за йоните на Pb (II) е достигната при рН 5.0, концентрация на биосорбента 2 g/L, температура 25°C и скорост на разбъркване 120 rpm за 120 min.

Изследвана е и възможността отпадна биомаса от *Bacillus thuringiensis* да бъде приложена като биосорбент за Pb (II), Cd (II) и Hg (II) от моделни водни разтвори (**Публикация III. 2.17.**). Топлинно инактивираната и алкално обработената биомаса показва способност за отстраняване на метални йони от единични разтвори в следния ред: Pb(II) > Cd(II) > Hg(II). Основните групи, участващи в биосорбция са хидроксилни/амино, алкилови, карбонилни и фосфорилови. Оценено е влиянието на различни фактори като рН, начална концентрация на сорбента, концентрация на биосорбента, време за контакт. Оптималните условия за процеса, с най-висок капацитет за отстраняване за Pb (II) са рН 5.0, доза на биомасата 1 g.dm⁻³ и време за контакт 90 min. Изследваният биосорбент е перспективен тъй като успешно премахва тежките метали от разтвори, съдържащи повече от един вид йони, което означава, че е ефективен при моделни условия, по-близки до реалните отпадни води.

Към приносите с екологично, но също и с приложно значение биха могли да се отнесат и резултатите, отразени в **Публикация III. 2.9.**, касаещи ефекта на нови, годни за консумация покрития, базирани на ниско молекулен хитозан върху свойства на прясно нарязани плодове от пъпеш - загуба на тегло, общо разтворими твърди вещества, обща киселинност, механична якост и микробен растеж. Допълнителният алгинатен слой значително подобрява защитните свойства на чистото хитозаново покритие, което води до запазване на клетъчната структура. Покритието от чист хитозан редуцира микробния растеж около 2 пъти в рамките на първите 24 ч., но разликата остава постоянна през времето на съхранение. Покритията на хитозан с Са лактат и алгинат също осигуряват защита, но в по-малка степен.

IV. Приноси към учебната дейност.

1. Автор на учебник:

С. Костадинова. „Микробен метаболизъм“, Университетско издателство „Паисий Хилендарски“, 2021, 287 стр., ISBN 978-619-202-641-7.

Учебникът по Микробен метаболизъм е предназначен за студенти от ОКС „бакалавър“ и „магистър“ на специалности в Биологическия факултет на Пловдивския университет „Паисий Хилендарски“.

Представени са катаболитните и анаболитните процеси при микроорганизмите, с акцент върху прокариотите, които се отличават с голямо метаболитно разнообразие, даващо им възможност да усвояват разнообразни субстрати и да се развиват във всички възможни местообитания на Земята. Подробно са разгледани катаболитните процеси и генерирането на енергия. Коментирани са биосинтезите на основните градивни компоненти на микробната клетка (въглехидрати, липиди, белтъци, нуклеинови киселини) от молекулите-предшественици. Поставен е акцент върху начина, по който микроорганизмите, усвояващи необичайни събстрати (напр. С1 съединения, ароматни въглеродороди) изграждат основите прекурсорни молекули.

Разгледан е уникалният метаболизъм при специфични групи микроорганизми, като метаногенни архебактерии, сулфатредуциращи бактерии, халобактерии, фототрофни прокариоти, които заемат специфични екологични ниши и имат голямо значение във физиологичните процеси в биосферата.

Познанията за метаболизма на микроорганизмите е в основата на изясняването на ролята им в околната среда, включително участието им в биогеохимичните цикли, установяването на антагонистични и симбиотични взаимоотношения, както и възможността за приложението им в биотехнологичните процеси.

2. Съавтор на ръководство по Микробиология:

С. Костадинова, В. Гочев, М. Мърхова, Т. Гирова, Д. Георгиев, И. Илиев. Ръководство по микробиология. 2017. Университетско издателство «Паисий Хилендарски», 265 стр., ISBN 978-619-202-240-2.

Ръководството по микробиология е разработено в съответствие с учебните програми за обучение на студентите в бакалавърски и магистърски специалности в Пловдивския университет „Паисий Хилендарски“.

Упражненията в ръководството са групирани тематично, което позволява на преподавателите да съставят необходимия набор за съответния учебен курс. Ръководството включва 10 основни раздела – „Микроскопски техники“, „Основни лабораторни културални методи“, „Морфология на микроорганизмите“, „Биохимична активност на микроорганизмите“, „Ефект на факторите на средата върху микроорганизмите“, в ръководството са включени и упражнения в областта на „Санитарната микробиология“, „Роля на микроорганизмите в кръговрата на веществата“, „Микробната генетика“ и „Медицинската микробиология“.

Целта на упражненията е студентите да придобият знания за съвременните експериментални техники в областта на микробиологията, както и умения за интерпретиране и отразяване на получените резултати.

3. Съавтор на учебник „Биологични мембрани“ :

И. Денев, Ст. Спасиева, Д. Стефанова, Е. Даскалова, М. Гевезова, М. Мърхова, **С. Костадинова**. Биологични мембрани. 2016, Електронно издание, Университетско издателство «Паисий Хилендарски», 181 стр., ISBN 978-619-202-111-5.

Учебникът представя съвременните познания за структурата и функциите на биологичните мембрани, базирани на научните открития през последните десетилетия. Учебникът е структуриран в три раздела. Първият раздел разглежда биохимичния състав и структурата на биологичните мембрани, както и структурните особености на мембранните компоненти. Вторият раздел е посветен на основните функции на мембраните – транспортна (пренос на ниско- и високомолекулни съединения), рецепторна и сигнална (предаване на вътреклетъчни и междуклетъчни сигнали). В третия раздел са представени специфичните мембрани в организмовия свят – устройството на мембраните при еубактерии и многообразните функции, които цитоплазмената мембрана концентрира. Разгледан е уникалният състав и строеж на археобактериалните мембрани, както и някои вътреклетъчни мембранни структури при прокариотите. Описани са вътрешни мембрани в растителни и животински клетки.

Пловдив

Август, 2021 г.

Изготвил:

Доц. д-р Соня Костадинова Трифонова