

РЕЗЮМЕТА

**на основните резултати и научните приноси
на доц. д-р Нели Влагова Георгиева
за участие в конкурс за академична длъжност „Професор“**

Представената научна продукция включва 46 научни труда. От тях 22 са публикувани в списания с импакт фактор, 14 в индексирани списания без импакт фактор, 10 доклади в пълен текст с редактор, 1 учебник, 1 ръководство, 66 постерни доклада с отпечатани резюмета.

Резюметата на основните резултати и научните приноси са групирани в следните тематични направления:

- I. Биосорбция на йони на тежки метали от *Trichosporon cutaneum* R57**
- II. Биосъвместимост на хибридни материали с метални наночастици и изследване на антимикробния им характер**
- III. Изследване пробиотичния потенциал на млечнокисели бактерии, изолирани от традиционни млечнокисели продукти**

I. Биосорбция на йони на тежки метали от *Trichosporon cutaneum* R57

Повишеното отделяне на тежки метали в околната среда благодарение на земеделските, индустриалните и военните операции и ефекта от замърсяване на екосистемите, рефлектира все по-сериозно върху човешкото здраве. Това е актуален проблем, водещ до необходимостта от въвеждане на екологично по-чисти технологии и по-ефективни обработки на отпадъците. Биоремедиацията на отпадъчни води се основава на способността на някои микроорганизми да преживяват в присъствие на високи концентрации на йони на тежки метали и да ги абсорбират посредством активни и пасивни механизми на натрупване. В тези процеси на биоремедиация на органични замърсители и извличане на йони на тежки метали преди всичко се включват дрожди и фунги. Предимството на тези микроорганизми се дължи на това, че те могат да натрупват големи количества йони на тежки метали от неблагоприятна външна среда – при ниско рН, имат висок капацитет на свързване на метала към клетъчната стена и могат да поддържат високо вътреклетъчно съдържание на метала. Биоремедиацията може да се използва, за да се понижи токсичността на замърсителя, неговата мобилност или обем до нива, които са безопасни за човека и заобикалящата го среда. Биологичните системи имат предимство

пред много други химични методи, тъй като при прилагането им не се натрупват токсични отпадъци и са напълно безвредни за околната среда. Биосорбентите предлагат ниски оперативни разходи, биомасата се самовъзпроизвежда, не се изискват транспортни разходи за извозването на отпадъците, нито място за съхранението им. Голяма част от изследванията са проведени с щам *Trichosporon cutaneum* R57. Щамът е авторски, описан и характеризира в предишни изследвания, регистриран в НБПМКК-София. Щамът е изолиран от активна утайка, способен е да използва ароматни съединения като единствен въглероден и енергиен източник – фенол, крезол и др. и може да се използва за третиране на отпадъчни води, характеризира се с богати физиолого-биохимични функции и висока резистентност към неблагоприятните условия на средата. Тези микроорганизми се използват успешно за трансформация на фенол, фенолни продукти, както и за биосорбция на метални йони.

Изследвана е токсичната толерантност и способността на щам *Tr. cutaneum* R57 за сорбция на йони на мед, кадмий, манган и хром от водна среда. Определени са праговете на инхибиране на тези йони. Концентрацията от 0.2 mM $K_2Cr_2O_7$ се разглежда като праг на инхибиране, тъй като се променя продължителността на растежните фази в сравнение с контролния вариант, концентрация от 0.6 mM $K_2Cr_2O_7$ - като умерена инхибиторна концентрация, тъй като растежа на дрождевите клетки е по-нисък в сравнение с предходната концентрация, а концентрацията от 1.5 mM $K_2Cr_2O_7$ - като летална за клетките (24, 28). За мангановите йони прага на инхибиране е 5 mM $MnSO_4 \cdot H_2O$, 10 mM е умерена инхибиторна, тъй като се наблюдава промяна в клетъчната морфология, а 20 mM $MnSO_4 \cdot H_2O$ е летална за изследвания щам. Ефективността на сорбиране намалява с увеличаване на използваната манганова концентрация. Сорбцията е най-бърза в първите 30 минути като при концентрация 5 mM $MnSO_4$ тя е 61.67%, а при 10 mM $MnSO_4$ тя е 42.04%. При най-високата използвана концентрация – сорбцията е едва 27.27 %. С увеличаване на инкубационното време сорбцията нараства, но увеличението е до 3-4 %. Най-ефективна е сорбцията в първите 30 минути (25).

По какъв начин растежът на микробната култура корелира с акумулирането на токсични йони от клетките, се разглежда като основен въпрос при изследване на токсичната толерантност (24). Поглъщането на йони от мъртвите клетки зависи само от дифузията (от пасивното поглъщане), докато поглъщането от живите клетки е сума от два механизма – активно и пасивно поглъщане. Следователно акумулацията на хроматни и респективно манганови йони от живите клетки е по-бърз процес в сравнение с акумулацията при мъртвите клетки. Например при концентрация от 0.2 mM $K_2Cr_2O_7$, ефективността на отстраняване на хром достига 23.7% след 2 часа хромна експозиция и след 24 часа се наблюдава процес на десорбция, ефективността намалява до 20.7%. Същата тенденция бе и при добавяне на 0.6 mM $K_2Cr_2O_7$ към култивационната среда. Сорбционният процес достига своя максимум след първите 2 часа от култивирането. Това може би се дължи на промяна в съотношението пасивно и активно поглъщане на йони. Намаляването на клетъчния растеж влияе повече на пасивното поглъщане, основано на йонната дифузия, докато активното поглъщане зависи от клетъчния метаболизъм.

Максимално отстраняване на хроматни йони беше наблюдавано при добавяне на 1.5 mM $K_2Cr_2O_7$ към културалната среда, където беше достигнато 25.57% отстраняване на тези йони. Степента на растеж на културата може да се разглежда като основен фактор, контролиращ акумулацията на хром. Вземайки това предвид, може да се каже, че акумулацията на хроматни йони е сума от акумулацията в живите и мъртвите клетки. Клетъчна стена на *Tr. cutaneum* R57 доказва свойства на добър йонообменник **(8)**. Това се дължи на наличието на значително количество полярни групи в клетъчната стена, способни да координират метални йони. Тези групи са SH-, OH-, COO-, -OCH₃ и други хидрофилни групи, част от полизахаридните молекули като глюкан и манан и някои протеини, включени в клетъчната стена на дрождите. Процесът на биосорбция с дрождева биомаса може да се разглежда като бърз процес и кинетиката на сорбция на хроматни и манганови йони е с продължителност 2 часа след металната експозиция **(2, 8, 24, 25)**. Този феномен може успешно да се използва при интегрирани пречистващи системи на отпадъчни води, съдържащи йони на тежки метали (в частност хроматни и манганови йони).

Изследвана е способността на три вида йони – хроматни, кадмиеви и медни за индуциране на оксидативен стрес в щам *Tr. cutaneum* R57 за кратък период от време. Проследена е реакцията на щама спрямо токсичните нива на металните йони и механизмът за отговор на тези дрожди. Интерес представлява и по-конкретно отговорът на клетките спрямо йоните на хром и мед, които са известни представители на редокс активното семейство, сравнени с отговора спрямо редокс неактивния кадмий. Изследваният щам показва толерантност и способност да акумулира в клетките си йони на изследваните метали. Високите нива на медни, хроматни и кадмиеви йони повишава образуването на реактивни кислородни радикали (ROS) в клетките на щама, както и натрупване на резервни полизахариди (гликоген и трехалоза) и се увеличи нивото на увредени белтъци в клетките. Метал-индуцираната токсичност предизвиква забавяне на растежа, понижаване на образуваната биомаса, морфологични промени в клетките и ускоряване на лизисните процеси. Клетъчният отговор включва активиране на антиоксидантните ензими, супероксид дисмутаза и каталаза, ключови ензими в деактивиране на ROS. По този начин активирана антиоксидантната защита спомага за преживяване на дрождевите клетки в условия на оксидативен стрес **(13)**.

Освен йони на тежки метали, друг важен замърсител на околната среда е фенолът и неговите производни и много често тези замърсители присъстват съвместно в даден биотоп. Изследван е растежът на щама в присъствие на фенол, като единствен въглероден източник и на различни концентрации на медни йони - от 0 до 3 mM. Установено бе, че при концентрации на медни йони от 0.025 до 3.0 mM $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, сорбционната ефективност на клетките достигна от 20 до 44 %. По този начин изследваният щам може успешно да се приложи при паралелни процеси на сорбция на медни йони и разграждане на фенолни съединения **(31)**.

Напоследък широко се използват техниките за имобилизация на микробна биомаса към различни носители при третиране на отпадъчни води, съдържащи йони на тежки

метали. Свързването на клетки има много преимущества пред използването на свободни клетки. Имобилизирването увеличава способността на микробната биомаса да извлича металните йони при използване на непрекъснати процеси на култивиране. Използването на свободни клетки при тези процеси на акумулация на различни йони ни дава информация за протичащите процеси при лабораторни експерименти, но свободните клетки трудно са приложими при индустриалните процеси, където мащабите са по-големи. Свободната клетъчна биомаса има ниска механична стабилност, малки размери и се осигурява относително ниска скорост на потока. Високото налягане може да причини дезинтеграция на клетките. Това може да се избегне с използване на процесите на имобилизация. Имобилизираната биомаса показва доста предимства, като многократно използване, осигурява се по-голям капацитет на поглъщане, минимално инхибиране на растежа в условие на непрекъснато култивиране. За тази цел бяха синтезирани хибридни материали и се изследва тяхната пригодност, изследваният щам да формира биофилм. Използвани са техники за имобилизиране на клетките – чрез прикрепване на повърхността на хибридният материал (25, 38, 39), и чрез включване в обема на матрицата (2, 37). Чрез зол-гелния метод бяха синтезирани хибридни материали с различно съдържание на хидроксипропил целулоза (HPC), карбоксиметил целулоза (CMC) и хидроксипропилметил целулоза (HPMC). Меките условия за протичане на зол-гелните процеси позволяват въвеждането на органични молекули в неорганичната решетка (1, 2, 8, 23, 25, 37, 38, 39). Получените хибридни материали бяха анализирани чрез следните методи: Рентгенофазов анализ, Инфрачервена спектроскопия с фурие трансформация, Определяне на специфична повърхност по BET, Сканираща електронна микроскопия (SEM). От направените изследвания се установи уплътняване на структурата на синтезираните хибридни материали с увеличаване количеството внесено целулозно производно. Въз основа на тези резултати се предполага, че с вариране състава на даден хибрид е възможно създаването на различни полифункционални материали, които биха намерили различно практическо приложение и преди всичко при формиране на биофилми от микроорганизми. Беше установено, че най-голям адсорбционен капацитет от имобилизираните клетки се получава при хибриден материал на основа 50 wt.% HPC и тетраетилортосиликат (TEOS), при което извличането на хроматни йони от средата достига максимална стойност от 37.37 %, докато при хибридният материал, съдържащ 50 wt % HPC и силициев диоксид получен от етилтриметокси силан (ETMS), извличането им достига максимална стойност от 24.52 %. Имобилизирването на клетките върху матрици със състав 5 и 50 wt.% HPC и SiO₂ получен от TEOS, не само запазва, но слабо увеличава техния адсорбционен капацитет по отношение на манганови йони. Този ефект е по-ясно изразен при по-високо съдържание на целулозния етер в матриците използвани за имобилизация, както и при по-високи начални концентрации на метални йони в средата (25, 38). Синтезирани чрез зол-гелния метод и охарактеризирани бяха и хибридни материали на основата на поливинилов алкохол (PVA) и различни органосилани като TEOS, аминопропилтриетокси силан (APTEOS) и меркаптопропил триетокси силан (MPTEOS). Използването на PVA като полимерна матрица намира широко приложение, което се дължи на добрите му химични и физични

свойства. PVA добре се разтваря във вода, биологически добре поносим, притежава ниска цитотоксичност, а неговата лесна преработка води до получаването на подходящи тънки филми. За подобряване на неговите физикохимични свойства се налага включването на различни органосилани TEOS, APTEOS и MPTEOS в полимерната матрица. Използването на тези прекурсори осигурява присъствието на различни функционални групи като хидроксилни (-OH), amino (-NH₂) и тиолни групи (-SH), които от своя страна ще спомогнат за имобилизацията на клетките. Получените хибридни материали са изследвани и за цитотоксичност. За тази цел са използвани клетки от миши ембрионни фибробласти 3T3. Резултати от теста за цитотоксичност показаха добра жизнестойкост на клетките култивирани за 24 часа в присъствие на хибридните материали **(1, 8, 9)**. Проследена е и динамиката на извличане на хроматни и манганови йони от свободни и имобилизирани дрождеви клетки. Получените резултати показват, че синтезираните хибридни материали на основата на PVA и органосилани като TEOS, APTEOS и MPTEOS могат да намерят успешно приложение като матрици за имобилизиране на клетки от вида *Tr. cutaneum* R57, които да бъдат използвани при пречистването на води, замърсени с йони на тежки метали **(1, 8, 9)**.

Получени са и хибридни материали на основата на SiO₂/акрилатни производни, както и полиелектролитни комплекси, в основата на които влизат пектин и метилметакрилат. Хибридните материали са структурно охарактеризирани чрез рентгенофазов анализ, инфрачервена спектроскопия, сканираща електронна микроскопия, диференциално термичен и термогравиметрични анализи, атомно-силова микроскопия, BET-анализ. Проследено е влиянието на вида на прекурсора върху обемната повърхност на синтезираните материали, което е от съществено значение при имобилизационните процедури. Резултатите показаха, че с най-голяма обемна повърхност са пробите, синтезирани на основата на прекурсор тетраметилортосиликат (TMOS) и 5 % органичен компонент **(2, 23, 37, 39)**. Прилагайки зол-гелния метод, бяха синтезирани хибридни наноматериали в системата SiO₂/полиметилметакрилат (PMMA), при използване на прекурсори TEOS и метилтриетокси силан (MTES) и съдържание 5, 10, 15 и 20 % PMMA. С помощта на BET анализ беше определена обемната повърхност на пробите. Увеличаването на количеството на органичния компонент води до уплътняване на структурата на синтезираните хибридни материали. Изследвана бе адхезионната способност на хибридни материали, като най-добри показатели бяха отчетени при варианти на PMMA, който бе избран за по-нататъшни изследвания при формиране на биофилм от *Tr. cutaneum* R57 и сорбция на хроматни йони. При формирането на биофилм върху този хибриден материал бяха получени най-високи стойности за извличане на хроматните йони след 2-я час от добавянето им **(39)**.

Изследваният щам *Tr. cutaneum* R57 беше имобилизиран и върху антибактериални хибридни материали със сребърни наночастици, с цел да се проследи влиянието на сребърните наночастици върху клетките. Тези хибридни материали показаха добра адхезивна способност и ниска цитотоксичност. Това ни даде основание да използваме антибактериалните хибридни материали за имобилизация на изследвания щам с цел

сорбция на металните йони. Въз основа на получените данни за сорбция на хроматни и манганови йони установихме, че ефективността на отстраняване на метални йони от щам е най-добра при най-ниски сребърни концентрации, като сорбцията достига до 50%, и може да бъде използвана едновременно като матрица, имаща добри бактерицидни свойства без да нарушава имобилизационния процес на *Tr. cutaneum* R57 и тяхната ефективност при отстраняване на метални йони. Следователно среброто в хибридният материал може да осъществи антибактериална активност чрез контакт с бактериалната мембрана, но не могат да бъдат поети и интернализирани от еукариотните клетки, а от друга страна сорбционите процеси протичат в първите минути от контакта на клетките с хроматните йони (24). Анализите за адхезия на антибактериалните материали показаха, че дори при по-висока сребърна концентрация в матриците където повърхностната грапавост е по-висока се наблюдава по-добра колонизация. Тези резултати предполагат, че грапавостта в нанометрични размери подобрява клетъчната адхезия и колонизация. Ето защо тези материали използвахме за имобилизация на *Tr. cutaneum* R57 и сорбция на хроматни и манганови йони, доказващи ефективност на извличане на тези йони. Получените антибактериални хибридни материали със сребърни наночастици - PVA/TEOS/Ag и НРС/TEOS/Ag могат да се използват не само като ефективни антибактериални агенти, но и като матрици за имобилизиране на клетки и прилагането им за почистване на замърсени води (7, 11, 40).

Получените резултати показват, че синтезираните хибридни материали могат да намерят успешно приложение като матрици за имобилизиране на клетки от вида *Tr. cutaneum* R57, които да бъдат използвани при пречистването на замърсени води с метални йони. Въз основа на създадените изотерми е определен сорбционният капацитет (q_{eq}) на свободни и имобилизирани клетки. При сравнение на q_{eq} при концентрации в интервала от 20 до 30 mg/L йони на съответните метали може да се направи извода, че щамът има сорбционен капацитет, нарастващ в следния ред: $Cr^{6+} - Cu^{2+} - Cd^{2+}$ (43). Акумулирането на метални йони от отпадъчни води в микробните клетки и използването на биотехнологични методи може да спомогне за получаването на алтернативни методи за детоксикация и пречистване на тези индустриални замърсители. От решаващо значение за приложението на биотехнологичните методи при извличане на йони на тежки метали от замърсени води е многократното използване на биосорбента с възможност за извличане на желан метал по електролитен път.

С резултатите от тези изследвания е защитена една дисертация (ас. д-р Невена Лазарова), няколко магистърски и бакалавърски дипломни работи и са публикувани следните статии:

1. R. Bryaskova, N. Georgieva, D. Peshev. Removal of cadmium and copper ions by *Trichosporon cutaneum* R57 cells immobilized onto polyvinyl alcohol/tetraetoxysilane hybrid matrices. Cent. Eur J. Chem 8, 5, 1053-1058, 2010. IF 1.329

Изследването е фокусирано върху синтеза на хибридни материали на основата на PVA и TEOS, използвани за имобилизиране на дрождеви клетки *Trichosporon cutaneum* щам R57. Получени са 3 вида материали, при които количеството TEOS варира (3 wt%, 5 wt%, 10 wt%). Представени са SEM микрографии на имобилизираните клетки върху повърхността на материалите. Получени са експериментални данни, въз основа на които е представен кинетичен модел за сорбцията на медни и кадмиеви йони от клетките на изследвания щам. Имобилизирани клетки и при трите типа хибридни материали показват високи нива на сорбция на медни и кадмиеви йони в сравнение със свободните клетки, а хибридният материал PVA/3 wt% TEOS се оказва с най-добри резултати за сорбция от имобилизираните клетки. Резултатите са обещаващи за използване на микроорганизмите в процесите на биоремедиация на медни и кадмиеви йони в отпадъчни води.

2. N. Georgieva, N. Rangelova, D. Peshev, S. Nenkova. Novel Pectin-Silica Hybrids used for immobilization of *Trichosporon cutaneum* cells efficient in removal of Cadmium and Copper ions from waste water. Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci. 64, 10, 1421-1428, 2011. IF 0.284.

Получени са неорганични/органични хибридни материали на основата на TMOS и ябълков пектин и са характеризирани с помощта на рентгеноструктурен анализ и инфрачервена спектроскопия, отчитащи аморфния характер на материалите, както и характерните пикове за SiO₂ и пектина. Към хибридните материали са имобилизирани клетки на филаментозни дрожди *Tr. cutaneum* R57 с методите на прикрепване и включване в обема на материалите. Имобилизирани клетки са визуализирани чрез SEM анализи. Проведени са експерименти за сорбция на медни и кадмиеви йони от клетки на изследвания щам, при което най-високи сорбционни нива са отчетени при клетките, имобилизирани чрез прикрепване, дължащо се на ограничени сорбционни места при методите на включване в хибридният материал. Имобилизирани клетки показват по-високи нива на сорбция в сравнение със свободните клетки, тъй като хибридният материал предоставя допълнително сорбционни места.

8. N. Georgieva, R. Bryaskova, N. Lazarova, D. Peshev, R. Tzoneva. PVA-based hybrid materials for immobilization of *Trichosporon cutaneum* R 57 efficient in removal of chromium ions. Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci. 66, 1, 35-44, 2013. IF 0.284.

Получени са хибридни материали на основата на PVA и TEOS, PVA и аминопропил триетоксисилан (APTEOS), и PVA и меркаптопропил триетоксисилан (MPTEOS) чрез зол-гелния метод. Използването на прекурсор като TEOS, MPTEOS и APTEOS осигуряват присъствието на различни функционални групи като хидроксилни (-OH), amino (-NH₂) и тиолни групи (-SH), които от своя страна ще спомогнат за имобилизацията на клетки от вида *Tr. cutaneum* R57. Получените по този начин хибридни материали са охарактеризирани с IR спектроскопия и термогравиметричен анализ (ТГА-ДТА) анализ, във въздушна атмосфера в температурен интервал от 25 до 700 °C. Проведени са експерименти за сорбция на хроматни йони от клетки на изследвания щам.

Имобилизирането на клетки върху хибридна матрица се дължи на тяхната адхезия към носителя в резултат на възникването на водородни връзки между хидроксилните групи (-OH), аминокислотни (-NH₂) и тиолни (SH-) групи от хибридните материали и карбоксилните групи (-COOH) или хидроксилни групи (-OH), произтичащи от клетъчната стена на дрождите. Използвайки APTEOS и MPTEOS като прекурсори за получаване на хибридните материали, се осигурява наличието на тиолни и аминокислотни групи в матрицата и дава допълнителни места за свързване на клетките към носителя, както и повишена сорбция на хроматни йони от функционализирането на хибридният материал.

- 9. N. Georgieva, R. Bryaskova, N. Lazarova, R. Racheva. Immobilization of *Trichosporon cutaneum* R 57 on PVA/TEOS/MPTEOS hybrid matrices for removal of manganese ions. J. Biotechnol and Biotechnol. Equipment, 27, 5, 4078-4081, 2013. IF 0.622.**

Синтезирани са хибридни материали на основата на PVA и меркаптопропил триетоксисилан (MPTEOS) и TEOS чрез зол-гелния метод. Наличието на MPTEOS като прекурсор за получаване на хибридните материали осигурява наличието на тиолни групи в матрицата и дава допълнителни места за свързване на клетките към носителя. Основавайки се на добрите адхезионни показатели на матрицата, тя бе използвана за имобилизиране на клетки на *Tr. cutaneum* R57 и сорбция на манганови йони от разтвори.

- 11. R. Bryaskova, N. Georgieva, D. Pencheva, Z. Todorova N. Lazarova T. Kantardjiev. Synthesis and characterization of hybrid materials with embedded silver nanoparticles and their application as antimicrobial matrices for waste water purification. Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects., 444, 114-119, 2014. IF 2.832.**

Синтезирани са нови хибридни материали на основата на PVA и аминокислотен триетоксисилан (APTEOS) с включени сребърни наночастици и използване на зол-гел метода. Материалите са характеризирани чрез спектроскопия в ултравиолетовата и видимата област (UV-vis) и трансмисионна електронна микроскопия (TEM). Анализите за адхезия на антибактериалните материали показаха, че дори при по-висока сребърна концентрация в матриците, където повърхностната грапавост е по-висока, се наблюдава по-добра колонизация. Тези резултати предполагат, че грапавостта в нанометрични размери подобрява клетъчната адхезия и колонизация. Ето защо тези материали използвахме за имобилизация на *Tr. cutaneum* R57 и сорбция на манганови йони, доказващо ефективност на извличане на тези йони, най-добра при материали с ниско сребърно съдържание.

- 13. N. Lazarova, E. Krumova, Ts. Stefanova, N. Georgieva, M. Angelova. The oxidative stress response of the filamentous yeast *Trichosporon cutaneum* R 57 to copper, cadmium and chromium exposure. J. Biotechnol and Biotechnol. Equipment, 28, 5, 855-862, 2014. IF 0.622.**

Настоящата разработка проследява способността на три вида йони – хроматни, кадмиеви и медни за индуциране на оксидативен стрес в щам *Tr. cutaneum* R57 за кратък период от време. Проследена е реакцията на щама спрямо токсичните нива на металните йони и механизмът за отговор на тези дрожди. Интерес представлява и по-конкретно отговора на клетките спрямо йоните на хром и мед, които са известни представители на редокс активното семейство, сравнени с отговора спрямо редокс неактивния кадмий. Изследваният щам показва толерантност и способност да акумулира в клетките си йони на изследваните метали. Високите нива на медни, хроматни и кадмиеви йони повишава образуването на реактивни кислородни радикали (ROS) в клетките на *Tr. cutaneum* R57, както и натрупване на резервни полизахариди (гликоген и трехалоза) и увреждане на белтъците. Клетъчният отговор включва активиране на антиоксидантните ензими, супероксид дисмутаза и каталаза, ключови ензими в деактивиране на ROS. По този начин активирана антиоксидантната защита спомага за преживяване на дрождевите клетки в условия на оксидативен стрес.

- 23. N. Rangelova, S. Nenкова, G. Chernev, N. Georgieva, L. Yotova, M. Salvado, M. Herzog. Synthesis, characterization and application of SiO₂ – methyl cellulose hybrid materials. Nanoscience and Nanotechnology, 10, 172-174, 2010.**

По зол-гелен метод са синтезирани хибридни материали на основата на TEOS и метил целулоза като органичен компонент. Материалите са използвани за имобилизиране на клетки на *Tr. cutaneum* R57. Получените данни за съдържанието на протеин показват, че с увеличение на количеството органичен компонент в хибридният материал, нараства и количеството свързани клетки при процеса на имобилизация. Максимална степен на извличане на медни и кадмиеви йони се постига при хибриден материал, съдържащ 50 % метил целулоза.

- 24. N. Georgieva, D. Peshev, N. Rangelova, N. Lazarova. Effect of hexavalent chromium on growth of *Trichosporon cutaneum* R 57. J. Chemical Technology and Metallurgy, 46, 3, 293-298, 2011.**

Способността на някои микроорганизми да взаимодействат с различни хромни съединения ги прави атрактивни в контекста на биотехнологията на околната среда. Филаментозните дрожди *Tr. cutaneum* щам R57 са култивирани в условия на периодично култивиране в течна хранителна среда в присъствие на различни концентрации Cr⁶⁺ от 0 до 1.5mM. Изследвано е акумулирането на Cr⁶⁺ йони от клетки на щама в зависимост от Cr⁶⁺ концентрация, както и влиянието на количеството добавена дрождева биомаса. Процесът на сорбция достига максимум след първите два часа култивиране. Максимална степен на отстраняване на хроматни йони се наблюдава при добавяне на 1.5 mM K₂Cr₂O₇ към културалната среда, където се достига 25.57% отстраняване на йоните.

- 25. N. Georgieva, D. Peshev, N. Rangelova, N. Lazarova, Ts. Angelova. Immobilization of *Trichosporon cutaneum* R 57 cells onto HPC/TEOS hybrid materials and removal of Mn^{2+} ions. Advance Bulg. Sci. 1, 33-38, 2011.**

Синтезирани са хибридни материали съдържащи TEOS като неорганичен прекурсор и хидроксипропил целулоза (HPC) като органичен компонент. Съотношението на органичния компонент бе 5 и 50 % спрямо неорганичната част. Структурата на получените хибриди е изследвана с помощта на инфрачервена спектроскопия и SEM анализ. Хибридни материали са използвани като носители за клетъчна имобилизация чрез прикрепване на филаментозни дрожди *Tr. cutaneum* R57 с доказана способност за отстраняване на манганови йони. Опитните данни за равновесната концентрация на адсорбата при използване на свободни клетки, като адсорбент са използвани за построяване на адсорбционната изотерма. Проведени са кинетични експерименти по биосорбция на манганови йони с имобилизирани клетки при начални концентрации на адсорбтива 275 и 550 mg/L. Тези стойности са подбрани въз основа на поведението на свободните клетки, илюстрирано чрез адсорбционната изотерма. Кинетично уравнение от псевдо-втори порядък е използвано за описание на опитните данни. Установени са по-високи стойности за концентрацията на адсорбата при имобилизирани клетки и при по-високо съдържание на HPC в матриците, използвани за имобилизация.

- 28. R. Bajgai, N. Georgieva, N. Lazarova. Bioremediation of chromium ions with filamentous yeast *Trichosporon cutaneum* R 57. J. of Biology and Earth Science, 2, 2, B70-B75, 2012.**

Настоящата разработка е фокусирана върху периодичното култивиране на щам *Tr. cutaneum* R57 в течна среда с добавяне на нарастващи концентрации на хроматни йони от 0 до 10 mM по време на стационарната фаза. Проследени са следните параметри – жизненост на клетките и консумация на глюкоза като функция на сорбционна ефикасност. Установено е, че максимална глюкозна консумация от клетките се наблюдава при 5 mM, а сорбционната ефективност достига максимум при ниски хромни концентрации - 1mM.

- 31. N. Lazarova, A. Valladares, N. Georgieva, R. Müller. Phenol degradation by *Trichosporon cutaneum* R 57 in the presence of copper ions. J. Chemical Technology and Metallurgy, 50, 5, 613-618, 2015.**

Освен йони на тежки метали, друг важен замърсител на околната среда е фенолът и неговите производни и много често тези замърсители присъстват съвместно в даден биотоп. Микроорганизмите, обитаващи такива места са особено важни за биотехнологичните изследвания на околната среда. Филаментозните дрожди *Tr. cutaneum* R57 са култивирани в периодичен режим в присъствие на фенол като единствен въглероден източник и нарастващи концентрации на медни йони от 0 до 3 mM. Изследван е растежът на щамата и разграждането на фенол при различни концентрации на медни йони. Установено бе, че при концентрации на медни йони от 0.025 до 3.0 mM $CuSO_4 \cdot 5H_2O$,

сорбционната ефективност на клетките достигна от 20 до 44 %. По този начин изследванията може успешно да се приложи при паралелни процеси на сорбция на медни йони и разграждане на фенолни съединения.

- 37. N. Rangelova, N. Georgieva, S. Nenкова, G. Chernev. Entrapment of yeast cells in sol-gel derived organic-inorganic hybrid materials. XVIII Intern. Confer. on Bioencapsulation – Porto, Portugal, Oct. 1-2, 2010, p 186-187.**

Синтезирани са хибридни материали на основата на метил целулоза и TEOS и пектин и TEOS по зол-гел метод. Материалите са използвани за имобилизиране на дрождеви клетки *Candida intermedia* PL 50 и *Tr. cutaneum* R57 чрез метода на включване в хибридният материал. Процеса на включване на клетките в материала е визуализиран с помощта на SEM. Въз основа на BET анализите за големината на порите в материалите и от данните за количеството клетки в материалите, може да се заключи, че хибридни материали на основата на пектин осигуряват възможност за достъп на хранителни вещества от средата, по-добро включване и растеж на клетките.

- 38. D. Peshev, N. Rangelova, N. Georgieva, G. Chernev. Yeast cells immobilization on HPC/SiO₂ sol-gel based materials for removal of Cr (VI) ions. XIX Intern. Confer. on Bioencapsulation – Amboise, France, Oct. 5-8, 2011, p 186-187.**

Получени са силициеви хибридни материали на основата на етил триметоксилан (ETMS) и хидроксипропил целулоза (HPC) с различно съдържание - 5, 20 и 50 wt % на органичната част. Материалите са използвани за имобилизиране на клетки на *Tr. cutaneum* R57. Проведени са изследвания за сорбция на хроматни йони от разтвора, като са определени прага на инхибиране на хроматните йони и той е установен при 0.2 mM K₂Cr₂O₇. Представен е и кинетичен модел на сорбция на хроматните йони от свободни и имобилизирани клетки.

- 39. G. Chernev, N. Georgieva, R. Tzoneva, I. Salvado, M. Fernandes PMMA-based hybrid materials for cell immobilization. XIX Intern. Confer. on Bioencapsulation – Amboise, France, Oct. 5-8, 2011, p 272-273.**

Прилагайки зол-гелния метод, бяха синтезирани хибридни наноматериали в системата SiO₂ /PMMA, при използване на прекурсор TEOS и съдържание 5, 10, 15 и 20 % PMMA. С помощта на BET анализ беше определена обемната повърхност на пробите. Увеличаването на количеството на органичния компонент води до уплътняване на структурата на синтезираните хибридни материали. С помощта на AFM бяха определени размерите на структурните агрегати и размерите на структурните единици. Изследвана бе адхезионната способност на хибридните материали с използване на 3T3 миши фибробласти, при което се установиха добри адхезионни показатели. Изследвано бе и формирането на биофилм от *Tr. cutaneum* R57 и сорбция на хроматни йони. При формирането на биофилм върху този

хибриден материал бе получено максимално извличане на хроматните йони след 2-я час от добавянето им.

- 40. N. Lazarova, N. Rangelova, N. Georgieva. Immobilization of *Trichosporon cutaneum* R57 onto SiO₂/HPC/Ag hybrid materials. XXII Internat. Confer. on Bioencapsulation – Bratislava, Slovak, Sept. 17-19, 2014, p 156-157.**

Получени са антибактериални хибридни материали SiO₂/HPC с включени сребърни наночастици. Количеството сребро в материалите варира от 0 до 1.5 wt%. Изследвано бе и формирането на биофилм от *Tr. cutaneum* R57 върху материалите със сребро, както и сорбция на хроматни йони. Установено бе, че с повишаване на сребърното съдържание в материалите, количеството прикрепени клетки намалява, вследствие инхибиране от сребърните йони в разтвора. Ниските сребърни концентрации обаче не оказват влияние на растежа на щама, а сорбционите процеси протичат в първите минути от контакта на клетките с хроматните йони. Тези резултати са обещаващи за съвместното използване на различни техники при процесите на пречистване на отпадъчни води.

- 43. Н. Лазарова, Д. Пешев, Н. Георгиева. Равновесие при биосорбция на йони на тежки метали от *Trichosporon cutaneum* R57. Сборник научни трудове на Русенския университет, т. 54, 10.2, 152-156, 2015.**

Проведени са експерименти с цел сравнение на сорбцията на метални йони от клетки на *Tr. cutaneum* R57 в свободно и имобилизирано състояние. Опитно е изследвано равновесието при сорбция на йони на три тежки метала - хром, мед, кадмий от клетки на щама и чрез нелинейна регресия са изведени съответните коефициенти в BET изотермите, q_m , K_s и K_L . Последните могат да бъдат използвани за целите на проектирането при биосорбция на метални йони. Въз основа на получените изотерми е определен сорбционният капацитет ($eq\ q$) на свободни и имобилизирани клетки. При сравнение на $eq\ q$ при концентрации в интервала от 20 до 30 mg/L йони на съответните метали може да се направи извода, че шамът има сорбционен капацитет, нарастващ в следния ред: $Cr^{6+}/Cu^{2+}/Cd^{2+}$.

II. Биосъвместимост на хибридни материали с метални наночастици и изследване на антимикробния им характер

В последните години се наблюдава повишен интерес към инкорпорирането на метални наночастици в различни хибридни полимерни матрици с цел стабилизиране на наноструктурите и получаване на материали, обединяващи свойствата на хибрида и наночастиците. Това ги прави интересен кандидат за приложение както в *in vivo* така и в *in vitro* биомедицински изследвания и в биотехнологията. Включването на метални наночастици в хибридни материали позволява формирането на устойчиви вещества,

притежаващи антибактериални и антифунгистични свойства и употребата им както като антимикробни средства срещу силно патогенни и лекарствено-резистентни микроорганизми, а също така и като преносители на лекарства, в образната диагностика, в регенерирането на тъкани и в изкуствени импланти.

В сравнение с органичните антибактериални материали, неорганично-органичните хибриди притежават редица предимства като механична здравина, химическа стабилност, термична устойчивост и имат сравнително малко странични ефекти за човека. Хибридните полимерни материали осигуряват стабилизиране на металните наночастици, снижаващо риска от бързо освобождаване на активния агент и удължава ефекта на тези материали, като ги прави приложими в биомедицината.

Получени са три типа неорганично-органични хибридни материали на основата на силициев диоксид, целулозни етери - НРС, хидроксипропил метилцелулоза (НРМС), карбоксиметил целулоза (СМС) и включени сребърни наночастици по зол-гелен метод. Структурата и повърхностната морфология на получените материали е характеризирана посредством Инфрачервена спектроскопия, атомно-силова микроскопия, SEM, TEM и BET анализи (4, 5, 10, 12, 20). Съдържанието на сребро в материалите варира от 0 до 2.5 wt.% водещо до промяна в повърхностната морфология от гладка до грапава с увеличение на сребърното съдържание. Сребърните наночастици равномерно са разпределени в материалите, наблюдават се сферични частици с размер 10-50 nm, а най-високата сребърна концентрация - 2.5 wt.% води до агрегация на частиците (4), срещат се и частици с неправилна форма (5). Малкият размер на частиците, както и неправилната форма са от съществено значение за по-доброто антибактериално действие. Съгласно UV-vis анализите среброто присъства в материалите под форма както на Ag⁺ така и на наночастици (10). Изследвани са антимикробните свойства на хибридните материали спрямо прокариотни и еукариотни микроорганизми. Като тест култури за Грам-отрицателни и Грам-положителни бактерии бяха използвани съответно *E. coli* K12 и *B. subtilis* 3562. Получените резултати показват дозо-зависим ефект на микробна чувствителност по отношение на използваната сребърна концентрация. *B. subtilis* 3562 се определя като по-чувствителен щам спрямо въздействието на материалите в сравнение с *E. coli* K12 (4, 5, 10, 12). Като тест-култури за еукариотни микроорганизми са използвани дрожди *S. cerevisiae* 537 (14, 33) и *C. albicans* 74 (16). Растежът на клетките и на двата щама се редуцира значително в присъствие на хибридните материали с висока сребърна концентрация. Наблюдава се морфологичен диморфизъм на клетките на *C. albicans* 74 в присъствие на материали, съдържащи сребро. Той се изразява в преход на клетките от патогенна – мицелна форма в апатогенна – дрождева форма. Изследваните материалите могат да се използват в биомедицината за превенция на гъбични заболявания (16).

Проведени са анализи, фокусирани върху изследване антимикотичния ефект на материалите спрямо *Asp. niger* 371 (30, 41) и *P. chrysogenum* 2303 (32). Въз основа на проведените експерименти е установена по-силно изразена чувствителност на *P. chrysogenum* 2303 спрямо тестваните хибридни материали в сравнение с *Asp. niger* 371. Хибридите потискат растежа на плесените само в първоначалните етапи на култивиране,

след което в по-късен етап се отчита невъзможност на материалите да окажат пълно инхибиране на шамовете. Поради тази причина ефектът, който хибридните материали оказват върху изследваните еталонни шамове плесени, може да бъде определен като фунгистатичен. Установено бе, че материалите с високо сребърно съдържание (2 wt.% и 2.5 wt.% Ag) повлияват процеса на спорулиране, което е предпоставка за потенциално приложение като покрития.

Много клинично значими патогенни бактерии са в състояние да колонизират, формирайки биофилми, които трудно се повлияват от традиционните антибиотици поради образуваната резистентост спрямо тях. Ето защо се обръща все повече внимание на хибридните материали с включени сребърни наночастици и тяхната анти-биофилм ефикасност. Проучена е и анти-адхезионната способност на SiO₂/HPC/Ag и SiO₂/HPMC/Ag хибридни материали при формиране на биофилм от *P. aeruginosa* PAO1 (20). Резултатите показват значителна редукция на формирания биофилм, което е предпоставка тези материали да се използват в тъканното инженерство, в денталната медицина и при изготвяне на катетри, където не се изисква клетъчна адхезия. Изпитани са също и десет щамове клинични изолати *P. aeruginosa*, резистентни на повече от два антибиотика, което ги определя като полирезистентни. Установено бе наличие на бактерицидно действие и при трите използвани хибридни материала със сребърни наночастици, като се наблюдава концентрация зависима активност (44).

Освен хибридни материали със сребърни наночастици, получени и изследвани са медни лигноцелулозни нанокомпозити. Морфологините изследвания показаха наличие на медни наночастици от клъстерен тип с различна форма и размери 10-50 nm (15, 21) с добри антибактериални свойства както срещу грам-положителни, така и срещу грам-отрицателни микроорганизми.

Изследвани са и нанокомпозитни материали с участието на SiO₂, ZnO, TiO₂ и редуциран графенов оксид (RGO), както и материали на основата на TiO₂ и SeO₂. Всички те показаха добри антибактериални свойства, което ги определя като подходящи и приложими в редица области (17, 19). Изследвани са и нов тип хибридни материали на базата на SiO₂/HPC с включени цинкови наночастици по зол-гелен метод. Антимикробната активност на материалите е изпитана по отношение на плесени *A. niger* щам 371 и *P. chrysogenum* щам 2303, при което се доказва добър антимицотичен ефект (46).

За прилагането на наночастици в биологията и медицината преди всичко е необходимо да се докаже тяхната биосъвместимост, т.е. способността на материалите да се имплантират в организма без да индуцират клетъчен отговор, с цел достигане на оптимален терапевтичен ефект. Като най-важно условие се приема безопасността на материалите. Те трябва да не предизвикват алергични реакции и да нямат токсичен или канцерогенен ефект. Отговаряйки на тези изисквания, материалите се определят като биосъвместими. Изследването на цитотоксичността на даден материал е първата стъпка от определянето на неговата биосъвместимост, по същество се определя биологичната реактивност на клетъчни линии на бозайници след контакт с материала. Едва след това се пристъпва към тестове *in vivo* и клинични изпитвания. Цитотоксичността се отнася до

увреждане на индивидуални клетки, например в клетъчни култури. Проучена е клетъчната преживяемост и адхезивността на 3Т3 миши фибробласти върху хибридни материали със сребърни наночастици. Получените резултати разкриват нарастваща клетъчна пролиферация на 3Т3 клетките, по-ясно изразена след 48 часа култивиране (14, 18, 20). По-високите сребърни концентрации водят до по-ниска клетъчна преживяемост. Това от една страна може да се обясни със свойствата на среброто като антимикробен агент, а от друга с по-високата грапавост и контактен ъгъл, определени при структурното охарактеризиране на материалите, съдържащи сребро (20). Клетките, навлизащи в апоптоза при високи дози сребро, претърпяват характерни морфологични изменения. Те включват свиване и кондензиране на клетката, разрушаване на цитоскелета и ядрената обвивка, кондензиране на ядрения хроматин, който се разпада на фрагменти, което ние наблюдавахме при материали с най-високите използвани сребърни концентрации (18).

Изследвани са хибридни материали на основата на поливинилов алкохол с включени сребърни наночастици. Анализите показват ниска цитотоксичност и добра виталност и адхезионна способност на фибробластните клетки, което ги определя като подходящи за използване в тъканното инженерство. Морфологията и пролиферацията на фибробластите не се променя и те свободно адхезират върху повърхността на хибридни материали дори и при високите концентрации на сребро. Изследваните антибактериални материали на основа на PVA осигуряват стабилизиране на сребърните наночастици, което намалява риска от бързо освобождаване на среброто и удължава ефекта на тези материали (7). Получени са резултати за най-добра клетъчна адхезия и виталност на фибробластите при биоразградими хибридни материали PVA/APTEOS, съдържащи аминогрупи, което ги определя като биосъвместими и подходящи за тъканно-инженерни конструкции в регенеративната медицина (3).

С резултатите от тези изследвания е защитена една дисертация (гл.ас. д-р Цветелина Ангелова), няколко магистърски и бакалавърски дипломни работи и са публикувани следните статии:

3. N. Georgieva, R. Bryaskova, R. Tzoneva. New polyvinyl alcohol-based materials for biomedical application. Materials Letters, 88, 12, 19-22, 2012. IF 2.437.

В настоящето изследване са синтезирани нови хибридни материали на основата на PVA/TEOS, PVA/APTEOS и PVA/MPTEOS и характеризирани с инфрачервена спектроскопия. Проведени са изследвания за виталност и адхезия на 3Т3 миши фибробласти, един от основните показатели, характеризиращ биосъвместимостта на материалите. Резултатите показват най-добра клетъчна адхезия и виталност на фибробластите при хибридни материали PVA/APTEOS, дължащо се на хидрофилната природа и повишеното съдържание на NH- групи в полимера. Този материал е с най-подходящо приложение в тъканното инженерство.

- 4. Ts. Angelova, N. Rangelova, R. Yuryev, N. Georgieva, R. Müller. Antibacterial activity of SiO₂/hydroxypropyl cellulose hybrid materials containing silver nano particles. Materials Science & Engineering C, 32, 5, 1241-1246, 2012. IF 3.420.**

Синтезирани са хибридни материали на основата на тетраетил ортосиликат (TEOS), прекурсор на SiO₂ и хидроксипропил целулоза (HPC) с включени сребърни наночастици. Структурата и повърхностната морфология на получените материали е характеризирана посредством Инфрачервена спектроскопия, атомно-силова микроскопия, SEM и BET анализи. Съдържанието на сребро в материалите варира от 0 до 2.5 wt.%, водещо до промяна в повърхностната морфология от гладка до грапава с увеличение на сребърното съдържание. Сребърните наночастици равномерно са разпределени в материалите, наблюдава се сферична форма на частиците с размер 50 nm, а най-високата сребърна концентрация - 2.5 wt.% води до агрегация на частиците. Изследван е антибактериалният характер на получените материали срещу грам-положителни микроорганизми – *B. subtilis*, както и срещу грам-отрицателни – *E. coli* K12, като най-високите сребърни концентрации водят до по-голям ефект и при двата щамове, а грам-положителните микроорганизми показват по-голяма чувствителност към материалите в сравнение с грам-отрицателните, дължащо се на разлика в структурата на бактериалната клетъчна стена.

- 5. N. Rangelova, N. Georgieva, K. Mileva, R.Yuryev, R. Müller. Synthesis and antibacterial activity of SiO₂-CMC-Ag hybrid materials prepared by sol- gel method. Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci. 65, 8, 1057-1064, 2012. IF 0.284.**

Получени са антибактериални хибридни материали на основата на етилтриметокси силан (ETMS), карбоксиметил целулоза (CMC) и сребро чрез зол-гел метод. Сребърната концентрация в материалите варира от 0 до 1.5 wt%. Хибридните материали са характеризирани чрез инфрачервена спектроскопия и SEM анализи, показващи различна форма на сребърните наночастици – сферични и кубични с размер от 50 до 80 nm. Антибактериалните анализи са проведени срещу референтни щамове на *B. subtilis* и *E. coli* K12. Резултатите показват 92% редукция на растежа при *B. subtilis* и 90% редукция при *E. coli* K12, което определя тези хибридни материали като надеждни антибактериални средства.

- 7. R. Bryaskova, N. Georgieva, T. Andreeva, R. Tzoneva. Cell adhesive behavior of PVA-based hybrid materials with silver nanoparticles. Surface & Coatings Technology, 235, 186-191, 2013. IF 2.199.**

Получени са антибактериални хибридни материали на основата на PVA и TEOS с включени сребърни наночастици (AgNps) по зол-гелен метод. Сребърната концентрация варира от 0.36 mg/mL до 1.8 mg/mL. Хибридните материали са характеризирани чрез TEM, SEM, TGA анализи, както и AFM и измерване на контактния ъгъл. Наблюдавани са както единични наночастици, така и агрегати от AgNps. Изследвана бе и възможността за

използване на тези хибридни материали в тъканното инженерство. За целта бе изследвана цитотоксичността на материалите, както и клетъчната адхезия на 3T3 миши фибробластни клетки чрез изследване на актиновия цитоскелет. Хибридните материали със сребърни наночастици, показаха ниска цитотоксичност и добра виталност и адхезионна способност на фибробластните клетки, което ги определя като подходящи за използване в тъканното инженерство. Включените сребърни наночастици в хибридните материали осигуряват антибактериален ефект чрез контакт с бактериалната мембрана, докато еукариотните клетки по-трудно поглъщат тези наночастици. Това бе потвърдено и от факта, че морфологията и пролиферацията на фибробластите не се променя и те свободно адхезираха върху повърхността на хибридните материали дори и при високите концентрации на сребро и образуваха монослой. Изследваните антибактериални материали на основа на PVA осигуряват стабилизиране на сребърните наночастици, което намалява риска от бързо освобождаване на сребро и удължава ефекта на тези материали.

10. N. Rangelova, L. Alexandrov, Ts. Angelova, N. Georgieva, R. Müller. Preparation and characterization of SiO₂/CMC/Ag hybrids with antibacterial properties. Carbohydrate Polymers, 101, 1166-1175, 2014. IF 4.568.

В настоящето изследване са получени хибридни материали на основата на карбоксиметил целулоза (CMC) и TEOS с включени сребърни наночастици по зол-гелен метод. Съдържанието на сребро варира от 0 до 1.5 wt%. Материалите са характеризирани чрез инфрачервена спектроскопия, доказваща свързването между целулозния етер (органичната част) и неорганичната – чрез водородни връзки. Съгласно UV-vis анализите среброто присъства в материалите под форма на Ag⁺ (абсорбционна ивица при 210 nm) както и наночастици (ивица при 300 nm). TEM и SEM анализите доказаха, че сребърните наночастици са с различна форма и размер и оформят клъстери. Антибактериалните анализи са проведени срещу *B. subtilis*, както и срещу *E. coli* K12, като и при двата изследвани щама се наблюдава добре изразена антибактериална активност, дори и при ниски концентрации на сребро в материалите, а с увеличаване на сребърната концентрация, се повишава и антибактериалния ефект. Друг фактор, определящ антимикробния характер на сребърните наночастици, е формата на частиците. При материалите с по-високо съдържание на сребро - 1.5 wt% се наблюдаваха наночастици с размер от 5 до 10 nm и неправилна, често заострена форма, докато при по-ниските концентрации – 0.5 wt% размерът на частиците бе 20 nm, а формата сферична. Частици с неправилна форма – триъгълна, заострена и пр. имат по-добре изразено антимикробно действие.

12. Ts. Angelova, N. Rangelova, H. Dineva, N. Georgieva, R. Müller. Synthesis, characterization and antibacterial assessment of SiO₂-hydroxypropylmethyl cellulose hybrid materials with embedded silver nanoparticles. J. Biotechnol and Biotechnol. Equipment, 28, 4, 747-752, 2014. IF 0.622.

Изследвани са друг тип антибактериални хибридни материали, получени на основата на хидроксипропил метилцелулоза (HPMC) и TEOS с включени сребърни наночастици по зол-гелен метод. Съдържанието на сребро варира от 0 до 2.5 wt.%. Материалите са характеризирани посредством инфрачервена спектроскопия и SEM анализ. Доказана е сферична форма на сребърните наночастици и размер около 30 nm. Антибактериалните анализи са проведени срещу референтни щамове на *B. subtilis* и *E. coli* K12, наблюдава се значително удължаване на началните растежни фази и формиране на добре изразени инхибиторни зони и при двата тествани щама. Отново грам-положителните микроорганизми показват по-голяма чувствителност при култивиране в присъствие на изследваните материали в сравнение с грам-отрицателните. Анализите определят изследваните материали с добър потенциал и приложение в технологиите за пречистване на води.

- 14. Ts. Angelova, N. Georgieva, N. Rangelova, T. Andreeva, R. Tzoneva, R. Müller. Cytotoxicity and antifungal activity of CMC/AgNps hybrid materials against *Saccharomyces cerevisiae* 537. *Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci.* 67, 10, 1355-1362, 2014. IF 0.284.**

Изследвана е цитотоксичността на получените хибридни материали на основата на карбоксиметил целулоза (CMC) и TEOS с включени сребърни наночастици. Съдържанието на сребро е от 0 до 1.5 wt%. Характеристиката на материалите е допълнена с атомно-силова микроскопия и е определен контактния ъгъл на омокряне. Цитотоксичността на материалите е тествана чрез пролиферативната активност на 3T3 миши фибробластни клетки. Доказано е, че при ниските сребърни концентрации - 0.5 wt% в хибридните материали не се нарушава клетъчната пролиферативна активност и след 48 часово култивиране. По-високите концентрации - 1.5 wt.% и продължителното култивиране води до снижаване на клетъчната виталност. Изследвано е и действието на получените материали срещу еукариотни микроорганизми – дрожди *Saccharomyces cerevisiae* 537. Наблюдавано е слабо инхибиране на растежа при ниски сребърни концентрации - 0.5 wt%, докато при по-високите концентрации – инхибирането е 66.05% след 24 часово култивиране.

- 15. N. Rangelova, S. Nenкова, N. Lazarova, N. Georgieva. Copper-based nanostructured lignocellulose materials with antibacterial activity. *Bulg. Chem. Commun.* 47, Special Issue A, 39-44, 2015. IF 0.320.**

В представената изследователска работа са показани резултати за получаване на медни лигноцелулозни нанокомпозиции. Дървесните влакна (ДВ) и технически хидролизен лигнин (ТХЛ) са използвани като лигноцелулозни материали. За получаването на медно-сулфидни лигноцелулозни нанокомпозиции са използвани двукомпонентна медно-редукционна система и лигноцелулозни материали. Модифицирането е проведено по метода на наситена пара. Съдържанието на мед в пробите е определено чрез термичен и киселинен

метод на разлагане с последващ ICP анализ (индуктивно свързана плазма), Връзката на медните йони с лигноцелулозния материал бе изследвана чрез инфрачервена (ИЧ) спектроскопия. ИЧ ивиците, наблюдавани при 3400 cm^{-1} показват, че основният механизъм на взаимодействие се осъществява чрез координационно свързване на медните йони с кислородни атоми на ОН групи в целулозата и в ароматно ядро на лигниновата макромолекула. SEM-EDS анализите показват наличието на медни частици върху повърхността на изследваните проби. От TEM изображенията бе установена склонността към образуване на клъстери от медни наночастици с различна форма. Размерът на образувалите се наночастици варира в интервала между 10-50 nm. Антибактериалната активност на модифицираните лигноцелулози бе тествана срещу грам-положителни (*B. subtilis* 3562) и грам-отрицателни (*E. coli* K12 407) бактерии. При сравняване на двата материала резултатите показват, че модифицираният ТХЛ, на медна основа, има по-добра антибактериална активност спрямо дървесно-влакнестия материал, като грам-положителните бактерии са по-чувствителни към медните наночастици в сравнение с грам-отрицателните, дължащо се на разлика в бактериалната клетъчна стена.

- 16. N. Georgieva, Ts. Angelova, A. G. Valladares Juarez, R. Müller. Antifungal activity of SiO₂/cellulose hybrid materials doped with silver nanoparticles against *Candida albicans* 74. Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci. 68, 10, 1259-1264, 2015. IF 0.284.**

Изследван е антигъбичния ефект на два вида хибридни материали със сребърни наночастици срещу опортюнистичните патогенни гъбички *Candida albicans* 74. Хибридните материали - SiO₂/HPC/Ag и SiO₂/HPMC/Ag, със съдържание на сребро от 0 до 2.5 wt.% са характеризирани в предишни наши изследвания. Антигъбичният ефект е доказан посредством два метода – метод на инхибиторните зони, формирани около материалите, показващ липса на растеж от изследвания щам и метод на редукция на клетъчния растеж при култивиране на щама в присъствие на изследваните материали. Установено бе, че хибриден материал SiO₂/HPC/Ag с най-високата сребърна концентрация - 2.5 wt.% показва най-добър антиминобен ефект – 88% клетъчна редукция в сравнение с другия изследван материал – 62.5%. Изследван бе и морфологичният диморфизъм, характерен за изследвания щам, при който дрождевата форма на клетката преминава в мицеларна, водеща до патогенеза. Култивирането на изследвания щам в присъствие на хибридните материали със сребърни наночастици не позволява формирането на мицеларни форми, клетките са единични с дрождевидна форма и непатогенни, т.е. неспособни да причинят инфекция. Изследваните материалите могат да се използват в биомедицината за превенция на гъбични заболявания.

- 17. A. Shalaby, Ts. Angelova, A. Bachvarova-Nedelcheva, N. Georgieva, R. Iordanova, A. Staneva, Y. Dimitriev. Sol-gel synthesis of materials in the system SiO₂ /ZnO /TiO₂/ RGO and their antimicrobial efficiency against *E. coli* K12. Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci. 69, 1, 25-30, 2016. IF 0.284.**

В представената разработка са получени нанокомпозитни материали с участието на SiO_2 , ZnO , TiO_2 и редуциран графенов оксид (RGO). Изследвани са фазообразуването и структурните промени с вариране на температурата - 200°C , 400°C и 800°C . Добавянето на RGO в композитите, съдържащи SiO_2 , ZnO , TiO_2 запазва аморфния характер на композитните материали дори при 800°C . Антибактериалните свойства на получените аморфни материали са тествани срещу грам-отрицателните бактерии *E. coli* K12 при използване на два метода – на инхибиторните зони, формирани около материалите и редукция на клетъчния растеж. Всички изследвани материали имат добър антибактериален ефект, но композитния материал със състав $75\text{SiO}_2*12.5\text{ZnO}*12.5\text{TiO}_2$ (wt%) се отличава с по-добри антибактериални показатели в сравнение с композитен материал $55\text{SiO}_2*12.5\text{ZnO}*12.5\text{TiO}_2*20\text{RGO}$ (wt%).

- 18. V. Uzunova, S. Apostolova, Ts. Angelova, M. Aleksandrov, R. Toshkova, N. Georgieva, R. Tzoneva. HPC hybrid hydrogels with embeded AgNPs for antibacterial scaffolds. Biocompatibility testing. Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci. 69, 5, 125-130, 2016. IF 0.284.**

В настоящето изследване се оценява биосъвместимостта на хибридни материали на основата на SiO_2 /HPC с включени сребърни наночастици. Съдържанието на сребро в материалите варира от 0 до 2.5 wt % Ag. Направена е оценка на цитотоксичността на материалите върху фибробластна клетъчна линия L929 като са проследени морфологичните промени в клетките. Хибридните материали с ниско сребърно съдържание до 1.5 wt % Ag показват добра биосъвместимост, докато фибробластите, култивирани в присъствие на материали с по-високо сребърно съдържание (2–2.5 wt % Ag) показват морфологични промени, водещи до апоптоза и високо ниво на цитотоксичност. Всички изследвания потвърждават дозо-зависим ефект на среброто в материалите и наличие на праг над който биосъвместимостта е компроментирана. Хибридните материали със сребърно съдържание 0.5 до 1.5 wt % Ag показват добра биосъвместимост, запазват антибактериалните си свойства и са подходящи за приложение в биомедицината.

- 19. A. Bachvarova-Nedelcheva, R. Iordanova, A. Stoyanova, N. Georgieva, Ts. Angelova. Sol-gel synthesis of Se and Te containing TiO_2 nanocomposites with photocatalytic and antibacterial properties. J of Optoelectronics and Advanced Materials, 18, 1-2, 5-9, 2016. IF 0.429.**

В настоящата разработка са представени нов тип хибридни материали, синтезирани по зол-гелния метод, съдържащи 20 and 25 mol % SeO_2 ($80\text{TiO}_2.20\text{SeO}_2$ и $50\text{TiO}_2.25\text{TeO}_2.25\text{SeO}_2$). Проведени са и фотокаталитични тестове на материалите, както и XRD анализи, които потвърждават наличието на наночастици от селен в аморфния матрикс. Двата типа композити са тествани за антибактериална активност срещу *E. coli* K12 с използване на метода на клетъчна редукция при култивиране на материалите в присъствие на тествания щам. Получените нанокомпозитни материали притежават добри антибактериални

свойства, а материалът със състав $50\text{TiO}_2.25\text{TeO}_2.25\text{SeO}_2$ показва 100% инхибиране на клетъчния растеж, което определя изследваните материали като подходящи и приложими в редица области.

- 20. Ts. Angelova, N. Rangelova, V. Usunova, N. Georgieva, T. Andreeva, A. Momchilova, R. Tzoneva, R. Müller. Cytotoxicity and anti-biofilm activity of SiO_2 /cellulose derivative hybrid materials containing silver nanoparticles. Turkish J of Biology, 40, 1278-1288, 2016, IF 1.343.**

Синтезирани са хибридни материали SiO_2/HPC и SiO_2/HPMC с включени сребърни наночастици с концентрации на среброто от 0 до 2.5%. Материалите са характеризирани в предишни изследвания, а тук са допълнени с термичен анализ (DTA) и AFM анализи, представени са данни и за контактен ъгъл на омокряне. Проведени са антибактериални анализи за влиянието на хибридните материали върху формирането на биофилм от тест микроорганизъм *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Резултатите показаха 35.7% редукция на образуването на биофилм от материал $\text{SiO}_2/\text{HPC}/2.5\%$ Ag и 30% редукция от материал $\text{SiO}_2/\text{HPMC}/2.5\%$. Изследвани бяха цитотоксичността и актин цитоскелетната организация на фибробластни клетки, култивирани в присъствие на тестваните материали като функция от повърхностната структура и съдържанието на сребро. Материалите с ниско сребърно съдържание са подходящи за приложение в тъканното инженерство, тъй като имат добри антибактериални показатели при ниска цитотоксичност при еукариотни клетки. Могат да бъдат използвани в денталната медицина и при изготвяне на катетри, където не се изисква клетъчна адхезия.

- 21. N. Rangelova, S. Nenкова, N. Lazarova, N. Georgieva. Preparation and antibacterial behavior of lignin-copper composite materials. Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci. 69, 12, 125-130, 2016. IF 0.284.**

Получени са медни нанокompозити чрез модификация на технически хидролизен лигнин по два метода – на водна баня (THLwb) и чрез наситена пара (THLss). Материалите са характеризирани чрез инфрачервена спектроскопия и DTA анализи. Антибактериалната активност на материалите е тествана срещу *B. subtilis* 3562 и *E. coli* K12 с помощта на два метода – на инхибиторните зони, формиращи около нанокompозитните материали и метода на редукция на клетъчния растеж на бактериите в присъствие на материалите. Резултатите показват, че по-добра антибактериална активност показва материал THLss, получен по метода на наситената пара, вероятно поради по-бързото освобождаване на медни йони в средата. Грам-положителните бактерии се оказаха по-чувствителни към действието на медта в сравнение в грам-отрицателните, поради различия в клетъчната стена при двата типа клетки.

- 30. Ts. Angelova, N. Georgieva, H. Dineva, N. Rangelova, R. Müller. Antifungal activity of silver doped hybrids based on silica and cellulose derivates against *Aspergillus niger*. J. Chemical Technology and Metallurgy, 49, 2, 121-127, 2014.**

Разработката е фокусирана върху изследване на антигъбичния ефект на два типа силициево хибридни материали с включено сребро срещу *Aspergillus niger*. Хибридните материали са на основата на SiO_2 и целулозните етери: хидроксипропил целулоза (HPC), хидроксипропилметил целулоза (HPMC) и сребро в концентрации от 0 до 2.5 wt %. Антимикробният ефект е установен чрез агар дифузионен тест и определяне на инхибиторния ефект на материалите върху растежа на тест-микроорганизмите. Резултатите показват, че с увеличение на сребърното съдържание в хибридните материали до 2.5 wt % се увеличава инхибиторният ефект. Материалите на основа SiO_2 /HPC, показват по-добър ефект на инхибиране в сравнение с другия изследван материал по отношение и на двата използвани метода. Изследваните материали могат да намерят приложение като антигъбични покрития в биомедицината и при методите за пречистване на води.

- 32. Ts. Angelova, N. Rangelova, Rania A. A. E. Mohamed, N. Georgieva. Antifungal effect of SiO_2 /cellulose ethers/Ag hybrid nanomaterials on the growth of *Penicillium chrysogenum* 2303. J. Chemical Technology and Metallurgy, 51, 2, 121-127, 2016.**

Изследван е антигъбичният ефект на три типа силициево хибридни материали с включено сребро срещу *Penicillium chrysogenum* щам 2303. С помощта на зол-гелния метод бяха приготвени хибридните материали на основата на SiO_2 и целулозните етери: хидроксипропил целулоза (HPC), хидроксипропилметил целулоза (HPMC) и карбоксиметил целулоза (CMC) и сребро. Антигъбичният ефект беше изследван срещу *P. chrysogenum* щам 2303 въз основа на измерване на инхибиторните зони при агар дифузионен тест. При контролните проби и пробите с ниско сребърно съдържание, мицелът на щама започва да спорулира и образува конидии. Беше наблюдавана и промяна в цвета на конидиите – от светло зелено към тъмно зелено и черно, типично за процеса на спорулиране. Пробите с високо сребърно съдържание (2 wt.% и 2.5 wt.%) повлияват процеса на спорулиране и цвета на конидиите остава светъл по време на култивирането. Хибридният материал, съдържащ HPMC и най-високата сребърна концентрация от 2.5 wt.% Ag има най-добре изразен антигъбичен ефект в сравнение с останалите хибридни материали.

- 33. Ts. Angelova, N. Georgieva, R. Müller. Antimicrobial activity of SiO_2 /cellulose ethers/Ag hybrid materials against *Saccharomyces cerevisiae* 537. J. Chemical Technology and Metallurgy, 51, 6, 686-692, 2016.**

Изследван е антимикробният ефект на хибридни материали на основата на хидроксипропил целулоза (HPC) и на хидроксипропилметил целулоза (HPMC) с включени сребърни наночастици срещу еукариотни микроорганизми - дрожди *Saccharomyces cerevisiae* 537.

Концентрациите на сребро варират от 0 до 2.5 wt %. Използвани са методите на агар-дифузионния тест и определяне на инхибиторния ефект на изследваните материали върху растежа на микроорганизмите. Високите сребърни концентрации повлияват растежа на изследвания щам водещи до 80% и 92% редукция на клетъчния растеж съответно при двата материала. Ниските сребърни концентрации обаче нямат значителен ефект върху жизнеността на дрождевите клетки, в същото време запазват антибактериалния си характер и биха могли да се използват в биомедицината.

- 36. M. Simeonova, D. Krystev, G. Ivanova, I. Abrahams, N. Georgieva, Ts. Angelova** **Synthesis, Characterization and Antibacterial Activity of Ciprofl oxacin Loaded Polymer Nanoparticles for Parenteral Application. International Journal of Nanomaterials, Nanotechnology and Nanomedicine, 3, 2, 34-43, 2017.**

Настоящото изследване представя получаване на наночастици поли (бутил цианоакрилат) натоварени с ципрофлоксацин (CfH-PBCN) подходящи за парентерално приложение. Получените резултати доказват ковалентно свързване между CfH и полимера, което би могло да затрудни освобождаването на CfH в таргетните клетки, напр. бактерии. Представени са няколко механизма на свързване на CfH с полимерната молекула, като най-добри резултати се получават при наночастици с размер 300 nm. Антимикробната активност на получените наночастици CfH-PBCN е изследвана срещу *Bacillus subtilis* 3562 и *Escherichia coli* K12, като резултатите от двата използвани метода потвърждават антибактериалния ефект на CfH в свободно и свързано в полимера състояние, като той не се променя и остава идентичен.

- 41. Ts. Angelova, V. Uzunova, N. Rangelova, R. Tzoneva, N. Georgieva. Antifungal effect of silver doped hybrid materials based on silica and carboxymethyl cellulose against Aspergillus niger. Sci. Works of University of Food Technol. Plovdiv, v. LXII, 2015, p 505-509.**

Проведено е изследване на антигъбичния ефект на SiO₂/CMC хибридни материали с включено сребро срещу *Asperillus niger*. Сребърното съдържание варира от 0 до 1.5 wt. %. Използвани са два метода – единият, основаващ се на измерване на формираните инхибиторни зони около материалите и другият, оценяващ инхибиране на мицелния растеж върху агаровата повърхност при контакт с материалите. Двата метода потвърждават антигъбичния ефект на материалите при всички използвани концентрации, но при продължително култивиране мицелният растеж се възстановява, което определя действието на материалите като фунгистатично.

- 44. Ц. Ангелова, К. Балчева, Д. Пенчева, Н. Георгиева. Антимикробна активност на целулозни хибридни материали съдържащи сребърни наночастици срещу клинични щамове Pseudomonas aeruginosa. Сборник научни трудове на Русенския университет. т. 54, 10.2, 157-162, 2015.**

Изследвани са три типа хибридни целулозни материали с включени сребърни наночастици - $\text{SiO}_2/\text{HPC}/\text{Ag}$, $\text{SiO}_2/\text{HPMC}/\text{Ag}$ и $\text{SiO}_2/\text{CMC}/\text{Ag}$ с две различни сребърни концентрации (0,5%; 1%), като допълнително е проследена и антимикробната активност на всеки един от материалите без включени сребърни наночастици. Изпитани са десет щам клинични изолати *P. aeruginosa*, резистентни на повече от два антибиотика, което ги определя като полирезистентни. Установено бе наличие на бактерицидно действие и при трите използвани хибридни материала с увеличаване концентрацията на сребърните наночастици в хибридните материали (концентрация зависи от активност). Установена бе най-голяма бактерицидна активност при $\text{SiO}_2/\text{HPMC}/\text{Ag}$ хибриден материал в сравнение с останалите два вида изпитани хибридни материали. Този тип хибридни материали имат потенциал за приложение в множество области на биотехнологичното и медицинско инженерство, антибактериални покрития и биофилми.

46. V. Simeonova, Ts. Angelova, Iz. Sablyova, N. Rangelova, N. Georgieva. Antimicrobial effect of SiO_2 /hydroxypropyl cellulose hybrid materials doped with zinc ions. Sci. Works of University of Food Technol. Plovdiv, v. LXIII, p 193-198, 2016.

Изследвани са нов хибридни материали - SiO_2/HPC с включени цинкови наночастици. Синтезирани са два типа материали – с източник на цинк $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ и $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Органичната част е 5 wt. %, а концентрацията на цинк варира от 0 до 5 wt. %. Изпитана е антимикробната активност на материалите по отношение на плесени *A. niger* щам 371 и *P. chrysogenum* щам 2303 с използване на метода на инхибиторните зони. Хибридните материали с $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ показват по-силно изразено антигъбично действие по отношение и на двата тествани щам в сравнение с другия материал. Предстои публикуване на данни, характеризиращи материалите и цинковите наночастици, но цинка е с доказано антибактериално действие и такъв тип материали са приложими в биомедицината, хранителната индустрия и др.

II. Изследване пробиотичния потенциал на млечнокисели бактерии, изолирани от традиционни млечнокисели продукти

Днес лечението с пробиотични микроорганизми се утвърждава като съвременно направление в клиничната медицина. Чрез тях се постига резистентност към инфекции, намаляване тежестта и продължителността на стомашни неразположения, причинени от вирусни и бактериални инфекции, употреба на антибиотици, лъче- и химиотерапия, подобряване на имунния статус и съпротивителните сили на организма. Въпреки това тези свойства не могат да бъдат прогнозирани или генерализирани за всички щамове, тъй като благоприятните ефекти са щамово-специфични. От друга страна разнообразието от млечни продукти със специфични физикохимични и органолептични качества се дължи не само на вида на млякото и технологията на производство, но и на вида на участващата микрофлора. От съществено значение е и източниците от които са изолирани да са

домашно приготвени млечни продукти, по традиционна технология, без добавка на индустриални стартерни култури, да бъдат естествени и екологично чисти. В тази връзка са изолирани и идентифицирани лактобацили от традиционни за България млечни продукти - кисело мляко, бяло саламурено сирене, извара и кашкавал. Това е началната стъпка в търсенето на щамове с пробиотични функционални характеристики и технологично-значими свойства, перспективни в разработката на нови функционални храни (34, 42). Отчетени са данни за коагулираща, казеинолитична и антимикробни характеристики на новите изолати. Изследван е антибактериалният ефект на супернатанти (от култури млечнокисели бактерии в експоненциална и стационарна фаза) и млека, ферментирани с новоизолираните лактобацили срещу *Escherichia coli* ATCC 25922, а резултатите показват ефективна антимикробна активност. Това дава възможност за приложението им като биопротективни култури при производството на млечнокисели продукти (45).

Направена е оценка на антибиотичната чувствителност на 25 новоизолирани млечнокисели бактерии (МКБ), което е важен критерий за всеки кандидат-пробиотичен щам при подбора на функционални щамове, съгласно изискванията за безопасност и функционалност на СЗО. Избрани са 19 често употребявани в клиничната практика антибиотици с различен механизъм на действие. Почти всички изследвани щамове показват резистентност към оксацилин, ванкомицин, пefлоксацин и левофлксацин. Изолираните щамове показват сходно поведение спрямо някои антибиотици, но значителна вариабилност по отношение на реакцията им спрямо тетрациклин. (42).

Във връзка с изясняване на пробиотичния потенциал и вероятно биологично действие на изследваната група лактобацили, е предложен алгоритъм за охарактеризиране на антихерпесното им действие. Скринингът на кандидат-пробиотични бактерии и техните компоненти за тяхната антивирусна активност е обещаващ път в търсенето на нови подходи за алтернативно лечение и стратегии за превенция. Комбинацията от МКБ и/или техни продукти, заедно с традиционните против-вирусни лекарства може да способства за откриването на синергично действащи съединения и на полезни формули за третиране на вирусните инфекции. МКБ и особено видовете от род *Lactobacillus* играят значителна роля в антивирусната активност като важен помощник на имунната система. От направените изпитвания става ясно, че антивирусната активност на щамовете МКБ се дължи на въздействие на няколко вирусни и клетъчни мишени едновременно. Един от начините за вирусна инактивация на пробиотичните МКБ, е директното взаимодействие „вирус-пробиотик” (35).

Паралелно с проведените класически морфологични, физиологични и биохимични изследвания е направена и молекулярно-таксономична характеристика на новоизолираните МКБ. Използвани са модерни молекулярни методи за идентифициране на групата на ниво вид/щам, с подходите на съвременната полифазна таксономия (Multiplex PCR и 16S рДНК секвенционен анализ). 23 новоизолирани МКБ са идентифицирани като представители на вида *Lactobacillus plantarum*. След секвениране на 16S рДНК гена, щамове, изолирани от различни млечни продукти, са идентифицирани

като *Lb. fermentum* (3 щам), *Lb. rhamnosus* (2 щам), *Lb. plantarum* (2 щам), *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (1 щам) и *Lb. paracasei* (1 щам) (22).

Изследвана е и малко популярната у нас пробиотична култура – кефир с цел подобряване на вкусовите и ароматни свойства на този продукт. Проведени са полупромишлени експерименти във фирма „Лактина” с използване на лиофилизирани закваски, а получените данни могат да се използват за въвеждане на продукта в производството и популяризиране на пробиотичните ефекти на кефира, съдържащ витамини, минерали, незаменими аминокиселини и лесно усвояеми протеини. Изследвано е влиянието на добавените дрожди *Saccharomyces boulardii*, както и щамове *Str. thermophilus*, влияещи на нивата диацетил в кефирния продукт и формиращи вкусовите качества (26, 27).

На пробиотичните бактерии и техните здравословни ефекти е посветен учебникът „Пробиотици”. В него систематично са изложени въпроси, свързани с предисторията, възникването и развитието на пробиотичната концепция, както и съвременните аспекти на идеята, основани на молекулярно-генетичните анализи и нормативните изисквания за пробиотиците в състава на различните препарати и функционални храни. Направена е комплексна оценка на кандидат-пробиотичните щамове по критериите за безопасност, функционалност и технологичност. Разгледани са антимикробната активност на млечнокиселите бактерии, както и потенциалните здравословни ефекти за гостоприемника (IV.1).

С резултатите от тези изследвания е в процедура за защита една дисертация (ас. Вероника Немска), няколко магистърски и бакалавърски дипломни работи и са публикувани следните статии:

22. V. Nemska, N. Georgieva, S. Danova. Molecular identification of *Lactobacillus* spp., isolated from traditional Bulgarian dairy products. European Journal of Biomedical and Pharmaceutical sciences. 4, 5, 467-473, 2017. IF 4.382.

С помощта на съвременна полифазна таксономия 23 новоизолирани млечнокисели бактерии (МКБ) са идентифицирани като представители на вида *Lactobacillus plantarum*. Броят на МКБ щамове, принадлежащи към вида *Lb. plantarum*, е около 49% от всички изследвани изолати, което показва стабилното присъствие на вида в различни домашни млечни продукти, консумирани в България. След секвениране на 16S рДНК гена, щамове, изолирани от различни млечни продукти са идентифицирани като *Lb. fermentum* (3 щам), *Lb. rhamnosus* (2 щам), *Lb. plantarum* (2 щам), *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (1 щам) и *Lb. paracasei* (1 щам). Получените резултати за два щам от катък са едни от първите данни от молекулярно-генетични анализи за млечнокиселата микрофлора на катък. Доказано е наличието на *Lb. fermentum* в проби от бяло саламурено сирене (щамове G7D и BS31), както и присъствието на вида *Lb. paracasei* в проба от кашкавал.

- 26. G. Ivanova, M. Momchilova, N. Rumyan, A. Atanasova, N. Georgieva. Effect of *Saccharomyces boulardii* yeasts addition on the taste and aromatic properties of Kefir. J. Chemical Technology and Metallurgy, 47, 1, 59-62, 2012.**

Кефирът е естествен пробиотик и съдържа витамини, минерали, незаменими аминокиселини и лесно усвояеми протеини, което има благотворен ефект за човешкия организъм. Обектът на изследването е подобряването на вкусовите и ароматни свойства на кефирната култура. Изследвано е влиянието на дрожди *Saccharomyces boulardii* при добавянето им към кефирната култура. Параметрите на кефира бяха изследвани чрез определяне на рН, титруема киселинност, вискозитет, тест за диацетил, определяне броя на млечнокисели бактерии (МКБ) и дрожди. Добавянето на *S. boulardii* към кефирната култура води до удвояване броя на дрождите, подобряващо и вкусовите качества на продукта. Бе установено и положително влияние на добавянето на ароматни култури шамове *Str. thermophilus*, влияещи на нивата диацетил в кефирния продукт. Процесите са проведени в полупромишлени условия с използване на лиофилизирани закваски, а получените данни могат да се използват за въвеждане на продукта в производството.

- 27. M. Momchilova, G. Ivanova, A. Atanasova, N. Rumyan, N. Georgieva. Study of gustatory and structural properties of kefir product. J. Scientific Study & Research Chemistry and Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry, Vol. XIII (2), 203-209, 2012.**

Настоящата разработка е фокусирана върху подобряване качествата на кефирна култура. Изследвани са качествата на кефирна култура, както и ефекта от добавяне на млечнокисели бактерии *Str. thermophilus*, в сравнение на ефекта от добавяне на дрожди *S. boulardii*. Оценени са показатели като рН, съдържание на диацетил, фактори, основно определящи вкусовите качества на продукта. Най-добри показатели са отчетени след добавката на *S. boulardii*, характерна за кефирния продукт.

- 34. V. Nemska, N. Lazarova, N. Georgieva, S. Danova. *Lactobacillus* spp. from traditional Bulgarian dairy products. J. Chemical Technology and Metallurgy, 51, 6, 693-704, 2016.**

Домашно-пригответените ферментационни млечни продукти са част от ежедневното меню на българина, но при част от тях полезната микробиота е слабо проучена. Затова всяко изследване, целящо изолирането и идентификацията на МКБ от традиционни хранителни продукти спомага за определянето на автохтонната микрофлора, типична за района и е част от процеса по запазване традициите в производството на естествено защитени и функционални млечни продукти. С тази цел бяха събрани 26 проби от 4 вида традиционни за България млечни продукти: кисело мляко, бяло саламурено сирене, кашкавал и извара. Характеризирана е витална микрофлора и са изолирани 74 чисти култури. Доказано е тяхното отнасяне към род *Lactobacillus*, съгласно класическите подходи за идентификация

на щама. Началният скрининг за антимикробна активност доказва висок потенциал на биоактивни щамове МКБ, способни да потискат Грам (+) и Грам (-) бактерии. Това прави перспективно по-нататъшното охарактеризиране на създадената колекция от представители на род *Lactobacillus*.

- 35. V. Nemska, N. Bashkova, P. Genova-Kalou, S. Danova, N. Georgieva. Antiviral activity of lactobacilli against herpes simplex viruses. Сп. Хранително-вкусова промишленост, 5, 2017.**

Целта на настоящото проучване е да се изследва антивирусната активност на 8 щама от род *Lactobacillus*, изолирани от различни, традиционни за България млечни продукти (бяло саламурено сирене и кашкавал). Изследваните лактобацили не предизвикват никакви съществени изменения върху морфологията и преживяемостта на третираните клетки на гостоприемника. Щамове, инхибиращи репликацията на Херпес симплекс вирус HSV по дозо-зависим начин, са S7 и S8 (срещу HSV-1) и S7 и S9 (срещу HSV-2) като се наблюдава по-силно действие спрямо HSV-1, отколкото спрямо HSV-2. След проведените изследвания се установи, че щамове S7, S8 и S9 са ефективни и селективни инхибитори на HSV и се определят като обещаващи кандидат-пробиотични култури.

- 42. V. Nemska, N. Georgieva, S. Danova. Initial characterization and antibiotic susceptibility of lactic acid bacteria isolated from traditional dairy products. Sci. Works of University of Food Technol. Plovdiv, v. LXII, 2015, p 510-513.**

Направена е оценка на антибиотичната чувствителност на 25 новоизолирани млечнокисели бактерии, което е важен критерий за всеки кандидат-пробиотичен щам при подбора на функционални щамове, съгласно изискванията за безопасност и функционалност на СЗО. Освен това се следи и за отсъствието на хоризонтален пренос на гени за резистентност спрямо терапевтични антибиотици. Избрани са 19 често употребявани в клиничната практика антибиотици с различен механизъм на действие – инхибитори на синтеза на клетъчната стена, на протеиновата синтеза, на синтеза на нуклеинови киселини. Почти всички изследвани щамове показват резистентност към оксацилин, ванкомицин, пefлоксацин и левофлоксацин. Изолираните щамове показват сходно поведение спрямо някои антибиотици, но значителна вариабилност по отношение на реакцията им спрямо тетрациклин. Най-вероятната причина за това е наличието на преносими генетични детерминанти, кодиращи антибиотичната резистентност. Приемането на антибиотици води до елиминиране на полезната микрофлора в гастроинтестиналния тракт и улеснява развитието на патогенната микрофлора. От съществено значение при пробиотичните млечнокиселите бактерии е изучаването на антибиотичната чувствителност срещу клинично използваните антибиотици.

- 45. V. Nemska, N. Georgieva, S. Danova. Evaluation of technological parameters of newly isolated lactobacilli from traditional dairy products. Сборник научни трудове на Русенския университет. т. 54, 10.2, 7-12, 2015.**

В настоящето изследване са характеризирани 8 щамове новоизолирани млечнокисели бактерии от домашно приготвени бяло саламурено сирене и кашкавал, отнасящи се към род *Lactobacillus*. Отчетени са данни за коагулираща, казеинолитична и антимикробни характеристики на новите изолати. Изследван е антибактериалният ефект на супернатанти (от експоненциална и стационарна фаза) и млека, ферментирани с новоизолираните лактобацили срещу *Escherichia coli* ATCC 25922, а резултатите показват ефективна антимикробна активност. Това дава възможност за приложението им като биопротективни култури при производството на млечнокисели продукти.

IV. Други:

6. N. Georgieva, D. Kolev, T. Kolusheva, A. Marinova. **The solvability of a general enzyme model. Internat. J. of Differential Equations and Applications**, 12, 1, 1-12, 2013. IF 2.54.

В статията са разгледани математически модели на моноензимни реакции с придружаваща дифузия на продукта характерни за биохимичните системи. Реакциите протичат на два етапа, като първоначално има взаимодействие между субстрата (S) и ензима (E), което води до образуване на ензимно – субстратен комплекс (ES) и втори етап, на изхода на който се получава необратимо определен продукт (P) и се освобождава ензима, който е в малки количества. Като пример за такава реакция е използвана ензимната хидролиза на нишесте с участието на термостабилна α - амилаза. Известни са два математически модела описващи тези случаи. Намерени са критериите за стабилност на решенията на системата, което от своя страна води до стабилност на процеса на производство на получения в резултат на ензимната реакция продукт.

29. N. Georgieva, D. Kolev, T. Kolusheva, A. Matrinova, R. Popova. **On the existence for an enzyme reaction model. Internat. Electronic J. of Pure and Appl. Mathematics**. 6, 1, 31-40, 2013.

В настоящето изследване е представен класически математичен модел на ензимно катализирани реакции, проследяващ динамиката на ензимните процеси. Мерките за рейтинга на реакциите са зададени с помощта на коефициенти. Разгледани са два случая – когато реакциите протичат при естествени условия и когато съществува инхибитор на ензима.

Резултатите от научните изследвания са докладвани на редица национални и международни конференции, съгласно представения списък на участия.