

**СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ „СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ”**  
**БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ**  
**КАТЕДРА „ОБЩА И ПРОМИШЛЕНА МИКРОБИОЛОГИЯ”**



## **АВТОРЕФЕРАТ**

за присъждане на образователна и научна степен „доктор”  
Професионално направление 4.3. Биологични науки  
(Микробиология)

**РАЛИЦА ГЕОРГИЕВА АНГЕЛОВА**

# **Характеристика на неутрофилни железобактерии и използване на формираните от тях биогенни оксиди в нанотехнологии**

Научни ръководители: проф. д-р В. Грудева, БФ - СУ  
проф. д-р И. Недков, ИЕ - БАН

София  
2017

Дисертационният труд съдържа 204 страници на формат А4, 35 таблици и 120 фигури. В библиографската справка са включени 538 заглавия. Експерименталната работа е извършена в лабораторията по „Геологична микробиология” към Катедра „Обща и промишлена микробиология” на СУ „Св. Климент Охридски”; лаборатория „Жиромагнитна електроника” към ИЕ-БАН; лаборатория „Нови каталитични материали и наноразмерни катализатори” към ИК-БАН; лаборатория „Кристалохимия на композитни материали” към ИОНХ-БАН; Центърът за енергийни изследвания към Изследователския реактор на Унгарската академия на науките; лабораторията по Нанобиотехнологии към Чешката академия на науките и Регионалния център за модерни технологии и материали, Палацки университет, Оломоуц, Чехия; сканиращата електронна микроскопия е направена във Факултета по химия и фармация към СУ „Св. Климент Охридски” и ИФТТ-БАН.

Дисертационният труд е обсъден на разширено заседание на катедрата по Обща и промишлена микробиология към Биологически факултет на СУ „Св. Кл. Охридски“, проведено на 06.01.2017 г. и насрочен за защита пред научно жури, сформирано със заповед № ..... на Ректора на СУ „Св. Кл. Охридски“.

- Научно жури:
1. проф. д-р Венета Иванова Грудева
  2. доц. д-р Петя Койчева Христова
  3. проф. дбн Мария Богомилова Ангелова
  4. акад. проф. дфн Александър Георгиев Петров
  5. доц. д-р Павлина Александрова Симеонова

Защитата на дисертационния труд ще се състои на ..... от ..... часа в сградата на Биологически факултет на СУ „Св. Кл. Охридски“.

Материалите по защитата се намират на сайта на Биологически факултет и в катедрата по Обща и промишлена микробиология.

**СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ „СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ”**

**БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ  
КАТЕДРА „ОБЩА И ПРОМИШЛЕНА МИКРОБИОЛОГИЯ”**



---

**РАЛИЦА ГЕОРГИЕВА АНГЕЛОВА**

**Характеристика на неутрофилни  
железобактерии и използване на  
формираните от тях биогенни оксиди в  
нанотехнологии**

**АВТОРЕФЕРАТ**

за присъждане на образователна и научна степен „доктор”  
Професионално направление 4.3. Биологични науки  
(Микробиология)

Научни ръководители: проф. д-р В. Грудева, БФ - СУ  
проф. д-тн И. Недков, ИЕ - БАН

София  
2017

## СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ

- БЖО/ВІОХ** – biogenic iron oxides/ биогенни железни оксиди
- ИССЛ** - Изолационна среда за бактерии от групата *Sphaerotilus - Leptothrix*
- ПХБ** - поли-β-хидроксибутират
- СЕМ, SEM** - scanning electron microscopy, сканираща електронна микроскопия
- СА** - Среда на Адлер
- СВ** - Среда на Виноградски
- СЛ** - Среда на Лиске
- СФ** - Среда на Федоров
- ТЕМ** (Transmission electron microscopy) - трансмисионна електронна микроскопия
- $\alpha_L$**  (Langmuir constant) – константа на Лангмюр (L/mg)
- АВ 10В** (Amido black 10В) – багрило Амидо черно 10В
- АТСС** (American Type Culture Collection) – Американска колекция за микроорганизми
- BLAST** (Basic Local Alignment Search Tool)
- bp** (base pairs) – (бд) базови двойки
- CV** (crystal violet) - кристално виолетово багрило
- DRIFT** (Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy) – инфрачервена спектроскопия, записана в режим на дифузно отражение
- FF** (ferrofluid) - ферофлуид
- FISH** (Fluorescence In Situ Hybridization) - клетъчна хибридизация с флуоресцентно белязани олигонуклеотиди
- FTIR** (Fourier transform infrared spectroscopy) - инфрачервена спектроскопия с трансформация на Фурие
- GenBank NCBI** (National Center for Biotechnology Information) - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
- НА** (Hemagglutination activity) - хемаглутинационна активност
- MLS** (Magnetic *Leptothrix* sheaths) - магнитни природни калъфи от *Leptothrix* sp.
- MöS** (Mösbauer spectroscopy) - Мьосбауерова спектроскопия
- MW** (microwave synthesized magnetic nano- and microparticles of iron oxide) - магнитни нано- и микрочастици от железен оксид
- MSS** - Среда MSS (Mineral Salt Solution)
- μ-XAFS** (Micro X-ray absorption fine structure spectrometry)
- НАА** (Neutron activation analysis) - неутронно-активационен анализ
- NLS** (Nonmagnetic *Leptothrix* sheaths) - немагнитни природни калъфи от *Leptothrix* sp.
- P-1-O** (pseudo-first order kinetic model) - кинетичен модел от псевдо-първи ред
- P-2-O** (pseudo-second order kinetic model) - кинетичен модел от псевдо-втори ред
- RFLP** (Restriction Fragment Length Polymorphism) - полиморфизъм в дължината на амплифицирания фрагмент
- SEM-EDS** (Energy dispersive X-ray spectra - EDS) - енергийно-дисперсионна рентгенова спектроскопия посредством СЕМ
- SIGP** - Среда SIGP (Silicone Iron Glucose Peptone)
- TBE** (Tris/Borate/EDTA) – буфер, съдържащ Трис/Борат/ЕДТА
- XRD** (X-ray Diffraction - XRD) - рентгено-структурен анализ

## РЕЗЮМЕ

Дисертацията е свързана с изолиране и характеризиране на неутрофилни железобактерии от групата *Sphaerotilus-Leptothrix* и по конкретно от род *Leptothrix* и възможностите за използването на формираните биогенни железни оксиди/хидроксици.

Изолирани са 22 изолата от род *Leptothrix* и са подложени на обстоен таксономичен анализ. Използвана е таксономична схема съгласно определителя на Бърджи, включваща анализ на голям брой морфологични, физиологични и биохимични характеристики, разширявайки схемата с допълнителни биохимични характеристики. Оптимизирани са процедурите по изолация на ДНК и условията за провеждане на конвенционален PCR.

Проведени са изследвания за култивиране на бактериите върху различни хранителни среди и начини на култивиране, контролирайки съществени параметри за формирането на биогенни железни оксиди като рН и окисление на феройони. Проведен е детайлен микроскопски анализ (светлинна и сканираща електронна микроскопия) за описание растежа на бактериите и формирането на калъфни структури. Проведени са изследвания върху растежа на бактериите на определени хранителни среди и са анализирани основни растежни параметри.

Получени са нови данни за физичните и функционални свойства на биогенните железни оксиди/хидроксици с цел доказване на техния потенциал като нова генерация материали за приложение в електрониката, катализата, енергийните системи и екологията. Получени са данни и за кристалохимичния състав на биологичните желязо-съдържащи субпродукти и е доказано, че в резултат на метаболитната активност на бактериите от род *Leptothrix* се получават добре дефинирани наноразмерни прахове, съдържащи лепидокроцит, магнетит и гьотит. Изследвана е каталитичната активност на биогенния материал и получените резултати дават основание да се смята, че биогенните железни оксиди могат да бъдат модифицирани и използвани като носител на катализатори за окисление на СО. При изследване на потенциалните възможности на оксидите се установи, че изследваните функционални характеристики на три експериментални суперкондензаторни системи, базирани на биогенни железни оксиди/(окси)хидроксици (симетричен, асиметричен с био магнетит или био хематит) са силно ефективни.

Магнитно-модифицираните калъфи на *Leptothrix* sp. имат висок адсорбционен капацитет към багрила, лектини (белтъци) и метални йони.

## УВОД

Физиологичната група на неутрофилните железобактерии включва разнообразни по морфология, физиология и таксономичен статус бактерии, обединени по свойството си да окисляват  $\text{Fe}^{2+}$  при неутрално рН и да формират неразтворими железни оксиди/хидроксиди, водещи до сериозни замърсявания на околната среда и значителни икономически загуби. Същевременно, обаче формираните от тях неразтворими оксиди/хидроксиди представляват сериозен интерес за интензивно развиващите се нанотехнологии. Най-голямото предизвикателство в тази област е да се произвеждат биосъвместими наноразмерни железни оксиди/хидроксиди със суперпарамагнитни свойства за приложение в микро- и наноелектрониката, тъй като изискванията към тях стават все по-високи.

Образуваните от железобактериите неразтворими оксиди/хидроксиди след окисляване на феро желязото се отлагат върху бактериалната повърхност, а при някои родове се образуват специфични обвивки, наречени калъфи. Тези структури, както и оксидите, са от голям интерес за приложение в различни нанотехнологии, биомедицински и биоинженерни приложения като ферофлуиди, пигменти, адсорбенти, като контрастен агент за изображения от ядрено-магнитен резонанс, детоксикация на биологични течности и други. Железобактериите са типични хемоорганотрофи, способни да използват различни въглеродни източници, с дефинирано отношение към количеството на въглеродния източник, микроаерофили. Окислението на  $\text{Fe}^{2+}$  и/или  $\text{Mn}^{2+}$  не е свързано с енергетичния метаболизъм на бактериите и най-вероятно е защитен механизъм срещу токсичното действие на водородния пероксид, поради отсъствие на ензимите каталаза и пероксидаза. Бактериите от групата *Sphaerotilus* – *Leptothrix* са едни от най-интересните представители на калъфните бактерии. Те са типични бета протеобактерии, способни да окисляват  $\text{Fe}^{2+}$  и/или  $\text{Mn}^{2+}$ . Повсеместно са разпространени в различни елементи на околната среда, масово се развиват във водопроводни системи, помпени станции, пречиствателни станции, където причиняват сериозни увреждания и икономически загуби. От друга страна те могат да се използват в различни нанотехнологии. Независимо от интереса към тези бактерии, все още съществуват много неясни моменти в тяхната биология, свързани с липсата на достатъчна информация и ефективни процедури по тяхната изолация в чисти култури, оптималните условия за култивирането им в лабораторни условия, както и прилагането на надеждни критерии за видово диференциране на тези организми са особено важни и актуални. Изследванията в настоящия дисертационен труд са свързани именно с тези актуални въпроси.

## ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на дисертационния труд е характеристика на неутрофилни железобактерии от групата *Sphaerotilus–Leptothrix* и изследване на потенциалните възможности за формиране на биогенни железни оксиди/хидроксиди в лабораторни условия за приложение в електрониката, катализата и екологията.

За реализирането на целта са поставени следните конкретни задачи:

1. Количествена и качествена характеристика на неутрофилни железобактерии в естествени хабитати на планина Витоша.
2. Изолиране на чисти култури от род *Leptothrix* и идентификация чрез методи на класическата и молекулната таксономия.
3. Изследване на оптималните условия за получаване на наноразмерни биогенни железни оксиди/хидроксиди.
4. Характеристика на формираните наноразмерни железни оксиди/хидроксиди.
5. Изследване на потенциалните възможности на оксидите за приложение в електрониката, катализата и екологията.

## МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

### 1. Характеристика на района на пробовземане

#### 2. Пробовземане

Обект на пробовземане са наблюдаваните отлагания в избрания водоизточник (бавнотечащ поток в планина Витоша, местност “Коняръника”), отговарящи на описанието в литературата на характерните за целевите микроорганизми формации на повлекла с характерен цвят и консинстенция (Фиг. 1). Осъществени са две пробовземания през месеците юни и септември.



Фигура 1. Характерни отлагания във водния поток.

#### 2.1. Физикохимични параметри на водоизточника

Основните физикохимични параметри на водоизточника са извършени *in situ* с апаратура за теренни изследвания (EcoScan DO 6, Eutech Instruments Pte Ltd, PCcheckit, Lovibond), непосредствено преди пробовземането. Резултатите са посочени в Табл. 1.

Таблица 1. Физикохимични параметри на водата от хабитата (*in situ*).

| Параметър                                      | Проба 1* | Проба 2* |
|--|----------|----------|
| Температура (въздух) (°C)                      | + 22     | + 18     |
| Температура (вода) (°C)                        | + 14     | + 12     |
| Електропроводимост [ $\mu\text{S}/\text{cm}$ ] | < 40     | < 40     |
| Eh mV  | + 258    | + 312    |
| Активна реакция (pH)                           | 6.6      | 6.8      |
| Разтворен O <sub>2</sub> (мг/л)                | 8.0      | 7.8      |
| Fe <sup>2+</sup> (мг/л)                        | 5.25     | 5.05     |
| Mn <sup>2+</sup> (мг/л)                        | 2.4      | 0.9      |
| SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (мг/л)           | 52.2     | 58.7     |
| Cl <sup>-</sup> (мг/л)                         | 512.1    | 521.4    |
| CO <sub>2</sub> (мг/л)                         | 56.3     | 57.7     |
| Органичен C (мг/л)                             | 614.5    | 609.3    |

\* проба 1 – вода от I-во пробовземане през месец юни

\* проба 2 – вода от II-ро пробовземане през месец септември

#### 2.2 Осъществяване на пробовземането

Събирането на биомаса е осъществено от три различни пункта, находящи се на 5 метра отстояние един от друг, по протежение на водния поток.



### 3. Получаване на обогатени култури

#### 3.1. Първоначална обработка на събраната биомаса

#### 3.2. Анализ на пробите от района на пробовземане

Анализът на пробите за наличие на железобактерии е осъществен чрез светлинна и електронна микроскопия.

Количествената характеристика на микробните съобщества в определените за пробовземане хабитати е осъществена по стандартна процедура за количествен анализ (Метод на Кох и Метода на пределните разреждания) на проби от водата и проби от събраната биомаса от потока след обработката ѝ, включваща използване на селективни хранителни среди за отделните физиологични групи, обект на анализ. За всяка проба са направени по три повторения. Анализирани групи микроорганизми са подбрани на базата на литературни данни. Изследваните групи бактерии, използваните хранителни среди и условията на култивиране са посочени в Табл. 2.

**Таблица 2.** Хранителни среди и условия за количествено определяне на микроорганизмите.

| Микроорганизми                | Хранителна среда           | Параметри на култивиране |
|-------------------------------|----------------------------|--------------------------|
| Хетеротрофни аероби           | Месопептонен агар (МПА)    | 20°C за 48 ч.            |
| Спорообразуващи бактерии      | МПА + YGC (с пастъризация) | 20°C за 48 ч.            |
| Неутрофилни железобактерии    | Среда на Лиске (СЛ)        | 20°C за 14 дни           |
| Хемолитотрофни железобактерии | Тиосулфатна среда (ТС)     | 30°C за 7 дни            |
| Сулфатредуциращи бактерии     | Среда на Пфенинг (СП)      | 30°C за 3-7 дни          |
| Нитрифициращи бактерии        | Среда на Саратчандра (СС)  | 30°C за 3 дни            |

#### 3.3. Експериментална установка за култивиране на неутрофилни железобактерии

С цел имитиране на естествените условия за развитие на железобактериите са експериментирани три варианта за култивиране на бактериите както следва: 1) Конструирана е установка, позволяваща постоянна и регулираща се аерация на средата; 2) Като втори основен вариант на установка за култивиране на железобактерии са използвани колби на Ру и колби на Ференбах; 3) Използвани са класически Ерленмайерови колби от 500 мл. Хранителната среда е до 1/3 от обема на колбата.

#### 3.4. Използвани хранителни среди

- ⇒ Среда на Лиске (СЛ) (Lieske, 1919)
- ⇒ Среда на Федоров (СФ) (Leathen et al., 1956)
- ⇒ Среда на Виноградски (СВ) (Winogradsky, 1890).
- ⇒ Среда на Адлер (СА) (Ellis, 2003)
- ⇒ Изолационна среда за бактерии от групата *Sphaerotililus* - *Leptothrix* (ИССЛ) (van Veen, 1973)
- ⇒ Среда *MSS (Mineral Salt Solution)* (Hanert, 1981)
- ⇒ *SIGP (Silicone Iron Glucose Peptone)* (Sawayama et al., 2011)
- ⇒ Среда 803 за *Sphaerotililus-Leptothrix* (DSMZ, Germany)
- ⇒ Манганов агар (HIMEDIA).

Средите се различават по използвания железен източник и някои от компонентите на минералния състав на средите. Източникът на желязо е 1%.

### **3.5. Получаване на обогатени култури**

За получаване на обогатени култури са използвани елективните среди СЛ, ИССЛ и СА.

### **4. Изолиране на чисти култури**

Осъществено е върху твърда хранителна среда ИССЛ и среда 803 по стандартната процедура, като са използвани натривки от развилите се върху стъклените тръбички и предметни стъкла бактерии, както и от културалната течност. Култивирането е осъществено за 72 ч. при 20°C.

### **5. Идентификация на изолатите чрез методи на класическата таксономия**

За идентификацията на изолатите е използвана таксономична схема, съгласно определителя на Бърджи (Bergey's manual of determinative bacteriology, 9<sup>th</sup> ed, 1994).

### **6. Молекулни методи за идентификация на изолатите**

6.1. Изолиране на тотална ДНК и провеждане на агарозна гел електрофореза

6.2. Провеждане на конвенционален PCR анализ

6.2.1. С родово специфични праймерни последователности

6.2.2. С универсални еубактериални праймери

6.2.3. Състав на PCR мастър микс

6.2.4. Осъществяване на PCR анализа

6.3. Секвениране на PCR-продукти на 16S рДНК и биоинформатичен анализ на получените секвенции

6.4. RFLP анализ на амплифицирана 16S рДНК

### **7. Оптимизиране условията на култивиране за получаване на калъфи в лабораторни условия. Анализ на калъфите**

### **8. Оптимизиране параметрите на култивиране на изолатите**

### **9. Анализ на формираните железни оксиди/хидрокси**

9.1. Рентгено-структурен анализ (XRD)

9.2. Раманова спектроскопия

9.3. Трансмисионна електронна микроскопия (ТЕМ)

9.4. Магнитни измервания на получените железни оксиди/хидрокси посредством РРМС

9.5. Мьосбаурова спектроскопия (MöS)

9.6. Определяне на елементния състав на оксидите чрез неутронно-активационен анализ

### **10. Изследване на потенциалните възможности на оксидите за приложение в електрониката, катализата и екологията**

10.1. Биогенен гьотит като прекурсор за електрохимичен синтез на  $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> с приложение в суперкондензаторни батерии

10.2. Тестови изследвания за пригодността на биоматериалите като носители и катализатори. Каталитичен тест

10.3. Калъфи от *Leptothrix* sp. с остатъчна намагнитеност като ефективни и биосъвместими материали за биотехнологии и технологии за околната среда

10.4. Калъфи от *Leptothrix* sp. като адсорбент за отстраняване на синтетични багрила от водни разтвори

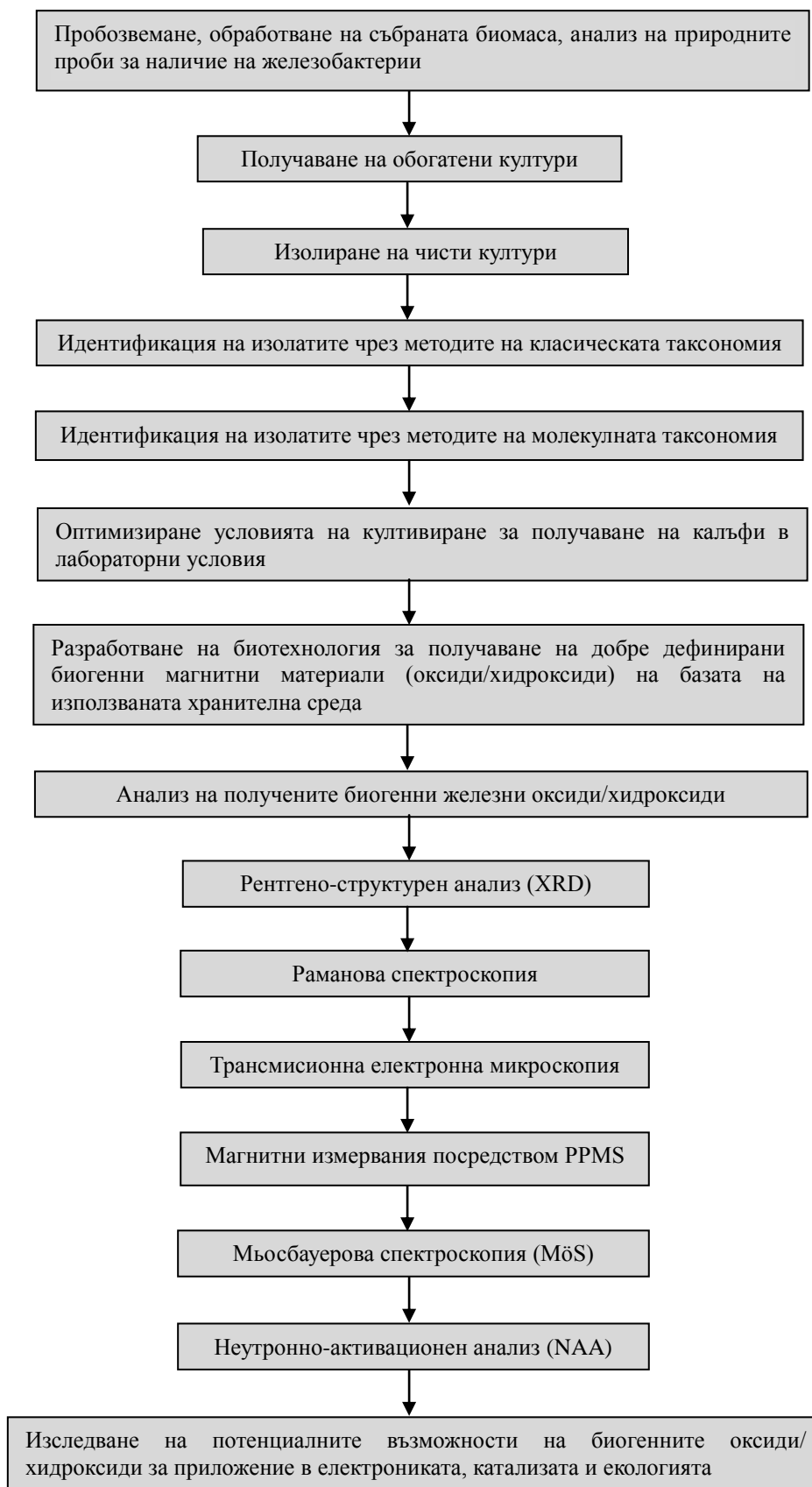
10.5. Калъфи от *Leptothrix* sp. с магнитни свойства като адсорбенти за имобилизиране на лектини, подходящи за магнитна сепарация

10.5.1. Тест за хемаглютинационна активност (НА)

10.5.2. Определяне количеството на имобилизираните белтъци

10.6. Калъфи от *Leptothrix* sp. като биосорбент на Ag йони

Последователността на извършените експерименти е осъществена по схемата, представена на Фиг. 2.

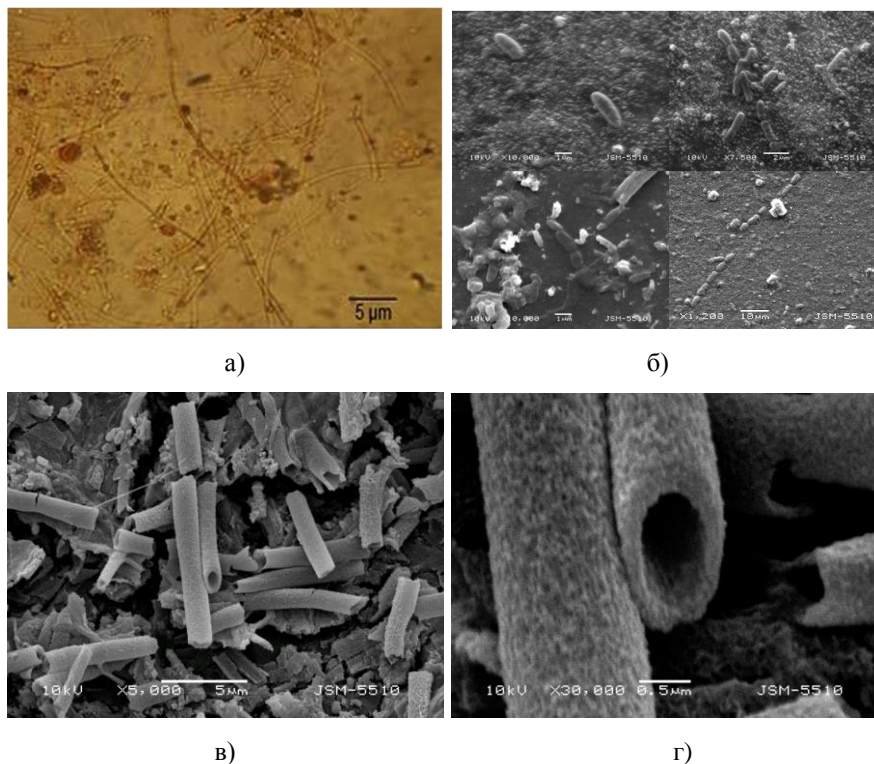


**Фигура 2.** Схема на проведените експерименти.

## РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

### 1. Анализ на пробите от района на пробовземане за наличие на железобактерии

Анализът на пробите е осъществен чрез светлинна и електронна микроскопия. Под светлинен микроскоп се наблюдават струпвания от бактерии с характерната за железобактерии морфология, както и калъфни структури, типични за бактериите от род *Leptothrix* (Фиг. 3 а). Електронната микроскопия потвърди наличието на очакваните бактерии, което е показано на Фиг. 3 б, в.



**Фигура 3.** Анализ на пробите от района на пробовземане за наличие на железобактерии: а) светлинна микроскопия; б) СЕМ на единични клетки и клетки във верижки; в) и г) СЕМ на калъфните структури.

Проведените микроскопски анализи показват, че в пробите присъстват представители на железобактериите и следователно може да се премине към количествена характеристика на микробните популации, получаване на обогатени култури и изолиране на чисти култури.

### 2. Количествена характеристика на микробните популации в избраните хабитати

Количественият анализ на микробните популации е осъществен с четири проби от хабитата, включващи две проби от водата (проба 1 и 2) и две проби от отлагания (проби 3 и 4). Резултатите от анализите са посочени в Табл. 3. Очевидно е, че съставът на микробните съобщества се различава значително в пробите от водата и отлаганията. Количеството на хетеротрофните аероби във всяка проба не надвишава  $10^5$  кл/мл.

Относително ниско е количеството на спорообразуващите бактерии, като по-високо количество е установено в твърдите проби. Хемолитотрофните бактерии присъстват само във водните проби, като количеството им не надвишава  $10^1$  кл/мл. Аналогична е и ситуацията при нитрифициращите бактерии. Сулфатредуциращи бактерии във водните проби почти не се срещат, докато количеството им в твърдите проби е по-високо. Единствената група, която е представена в значителни количества е тази на железобактериите. Във всички проби количеството им е  $> 10^5$  кл/мл, като в една от твърдите проби е  $> 10^6$  кл/мл. Резултатите от количествения анализ са в добра корелация с данни в литературата за оценка на микробните съобщества в такива хабитати (Ridgway et al., 1981; Emerson et al., 2010). Те не са изненадващи като се имат предвид специфичните физикохимични характеристики на водите от такъв тип хабитати. Количеството на органиката е ниско, което ограничава развитието на аеробни хетеротрофи, рН на средата е около неутралния пункт, което ограничава развитието на хемолитотрофните железобактерии. Количеството на разтворения кислород във водата не е високо, но същевременно ограничава развитието на сулфатредуциращите бактерии, докато в пробите от отлаганията се създават микроанаеробни зони и затова тяхното количество в тези проби е значително по-високо. Неутрофилните железобактерии се развиват активно, тъй като параметрите на средата удовлетворяват техните изисквания. В потвърждение на това са данните от химичния анализ на параметрите на водните проби (Табл. 1). Получените данни за количествения анализ на микробните популации в определените за пробовземане хабитати имат пряко отношение към последвалите изследвания за неутрофилните железобактерии. Те категорично потвърждават, че посочените места са подходящи за изолиране на тези бактерии, тъй като се явяват тяхната естествена екологична ниша.

**Таблица 3.** Количествена характеристика на микробното съобщество в проби от хабитата.

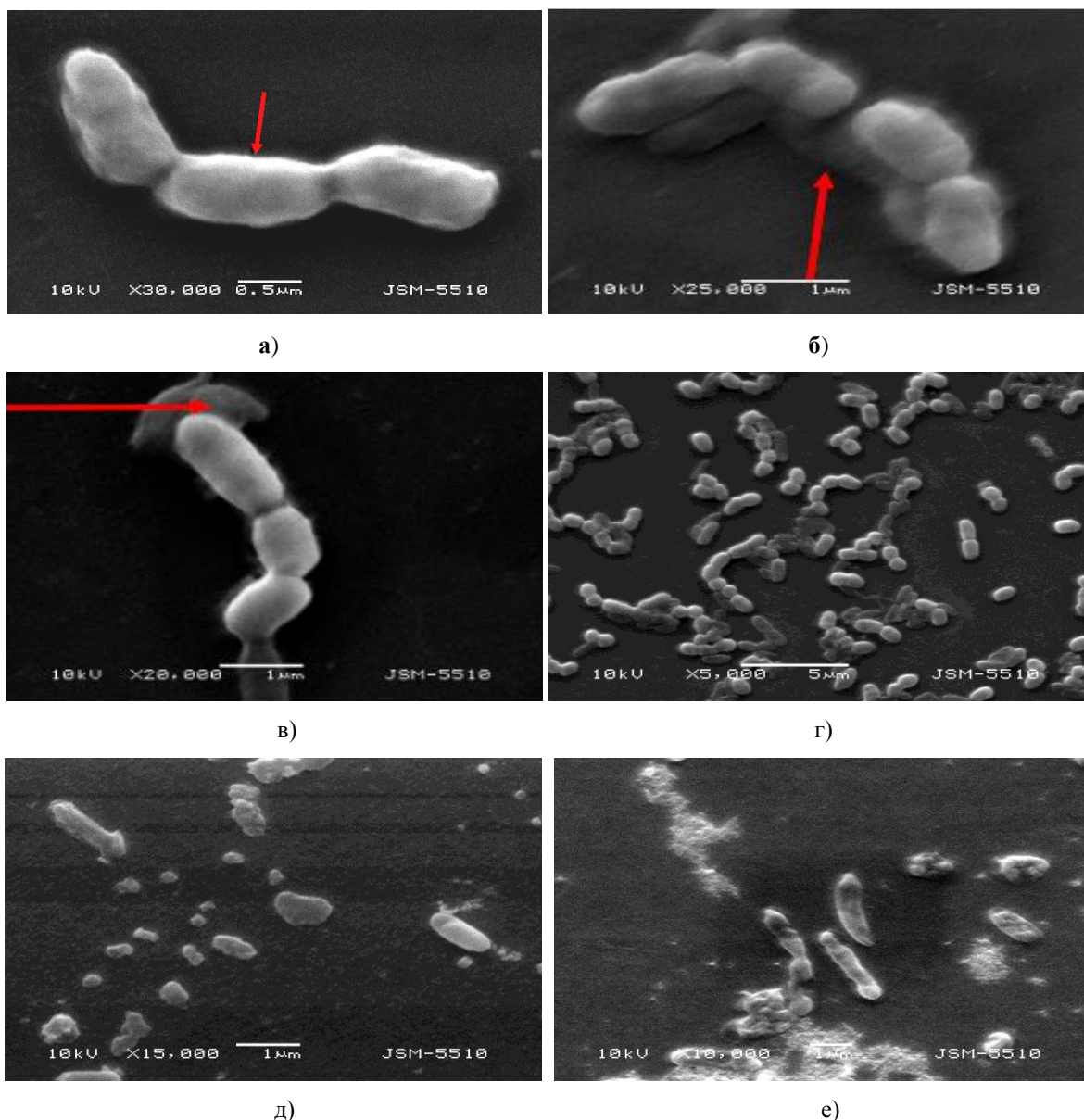
| Микроорганизми                | Количество микроорганизми (брой кл/мл) |                           |                           |                           |
|-------------------------------|--|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                               | Проба №                                |                           |                           |                           |
|                               | 1                                      | 2                         | 3                         | 4                         |
| Хетеротрофни аероби           | $0.1 \pm 3.1 \times 10^4$              | $0.1 \pm 2.8 \times 10^4$ | $0.8 \pm 4.9 \times 10^5$ | $0.1 \pm 2.2 \times 10^5$ |
| Спорообразуващи бактерии      | $0.9 \pm 1.1 \times 10^1$              | $0.2 \pm 2.1 \times 10^2$ | $0.7 \pm 3.1 \times 10^3$ | $0.9 \pm 3.1 \times 10^2$ |
| Неутрофилни железобактерии    | $0.5 \pm 1.1 \times 10^5$              | $0.2 \pm 3.8 \times 10^4$ | $0.1 \pm 3.1 \times 10^5$ | $0.1 \pm 1.1 \times 10^6$ |
| Хемолитотрофни железобактерии | $0.1 \pm 1.1 \times 10^1$              | $0.4 \pm 2.1 \times 10^1$ | ---                       | ---                       |
| Сулфатредуциращи бактерии     | $0.1 \pm 2 \times 10^1$                | ---                       | $0.1 \pm 3.4 \times 10^2$ | $0.1 \pm 3.1 \times 10^6$ |
| Нитрифициращи бактерии        | $0.5 \pm 3.1 \times 10^1$              | $0.9 \pm 3.4 \times 10^1$ | ---                       | ---                       |

Анализът на присъстващите в хабитата железобактерии е ориентиран и е направен единствено чрез микроскопиране. В една от водните проби се предполага, че присъстват бактерии от род *Gallionella* и род *Ochrobium*. Представители на род *Pedomicrobium* са установени във водните проби. Във всички изследвани проби обаче имаше данни за наличие на бактерии от групата *Sphaerotilus-Leptothrix*, което ни даде основание да пристъпим към оптимизиране на процедурата за получаване на обогатени култури.

### **3. Оптимизиране условията на култивиране за получаване на обогатени култури по начин на култивиране и тип на хранителна среда**

Намирането на най-подходящия начин на култивиране за получаване на обогатени култури произтича от особеностите на самите бактерии - микроаерофили, прикрепени към субстрата, олигокарбофили. Изследвани бяха три варианта на култивиране - статично в колби на Ру и Ференбах, динамично на шейкър с минимално разклащане и култивиране в конструирана за целта установка със специфично разположение на стъклени пластинки в нея и допълнително аериране. Последната се препоръчва от редица автори като имитираща условията в хабитата (Emerson & Ghiorse, 1992; Sawayama et al., 2011).

Резултатите от използването на различните варианти на култивиране са доста противоречиви. При варианта на култивиране, осъществено в конструираната установка, резултатите не са положителни. Микроскопският анализ, извършен на свежи и фиксирани препарати, показва изключително ниско съдържание на бактерии. Не се наблюдават и морфологичните типове, характерни за железобактериите. След 14-ия ден на култивиране не се наблюдават характерните изменения на средата, типични при развитие на железобактерии. Слабото пожълтяване на средата се дължи най-вероятно на химичното окисление на желязото. При култивирането на шейкър резултатите са аналогични. Най-добри резултати се получават при култивирането на бактериите при статични условия, но в колби със специфична форма, малко количество хранителна среда и достатъчен свободен обем на колбата. Периодичният микроскопски анализ показва наличие на бактерии с характерна за железобактериите морфология (Фиг. 4).



**Фигура 4.** (а) Типична форма на клетката с грапава повърхност от среда на Адлер; (б) Фалшиво разклоняване на бактериални клетки от среда ИССЛ; (в) Прикрепителен диск на бактериална клетка от среда на Адлер; (г) Панорамен изглед на бактериите от среда на Адлер; (д) Бактерии, култивирани на среда MSS; е) Бактерии, култивирани на среда Федоров.

Наблюдават се типични филаменти от клетки чрез светлинна микроскопия, което се потвърди посредством електронна микроскопия, като се наблюдава и характерната грапава повърхност на клетките във филаментите, типична за неутрофилните железобактерии (Фиг. 4).

Неуспехът при култивирането в конструираната установка и това при динамични условия вероятно е свързано с нарушаване на възможността за прикрепване на бактериите от една страна, и вероятно не е оптимално количеството на разтворения кислород в средата за култивиране. Най-вероятната причина за оскъден растеж при двата варианта за култивиране е свързана с конкретните параметри на средата,

инхибиращи развитието на бактериите. Важен фактор е количеството на кислорода. Възможно е разтворения кислород да е в повишено количество и да инхибира развитието на бактериите. Друг вероятен фактор, ограничаващ бактериалния растеж е количеството на CO<sub>2</sub>, който не е контролиран по технически причини.

В резултат от проведените експерименти може да се обобщи, че част от използваните хранителни среди и култивирането при статични условия са подходящи за получаване на обогатени култури. Наблюдават се типичните за железобактериите филаменти от клетки. Чрез електронна микроскопия е наблюдавана характерната грапава повърхност на клетките в образуваните нишки. Като подходящи среди за получаване на обогатени култури могат да се посочат средите на Адлер, Лиске и ИССЛ. В тези среди бактериите се развиват интензивно и се получава достатъчна по численост популация за изолиране на чисти култури.

#### **4. Изолиране на чисти култури**

От получените обогатени култури са изолирани чисти култури, като за тази цел са използвани изолационната среда за бактерии от изследваната група (ИССЛ) и среда 803 – среда за *Sphaerotilus-Leptothrix*. Същите среди са използвани и за поддържането на изолатите. Изолирани са общо 22 чисти култури от различни обогатени хранителни среди – Адлер, Лиске и ИССЛ, които са обект на таксономични изследвания.

За отдиференциране на изолатите от другите представители на калъфните бактерии, те са анализирани по разработена диференцираща схема на базата на микроскопски анализ, подвижност и окисление на железни и манганови йони.

Анализът на резултатите дава основание да се приеме, че изолатите са представители на род *Leptothrix*, тъй като представителите на род *Sphaerotilus* са сходни по морфология и подвижност с тези от род *Leptothrix*, но не окисляват манганови йони.

#### **5. Идентификация на изолатите по методите на класическата таксономия**

За идентификацията на изолатите е използвана таксономична схема, съгласно определителя на Бърджи (Bergey's manual of determinative bacteriology, 9<sup>th</sup> ed, 1994). Използвани са схеми, включващи морфологични, културални и биохимични характеристики. Морфологичните характеристики на изолатите са посочени в Табл. 4. Всички изолати са пръчковидни по форма, с размери в границите на установените за род *Leptothrix* с известни изключения (Табл. 4). Някои от изолатите са с размери по-големи от средните за рода. Формират нишки от клетки с различна дължина. Всички изолати са подвижни и натрупват полихидроксибутират (ПХБ) като резервно вещество при култивиране на среда с пептон. Нито един от изолатите не образува спори, не натрупва гранулеза и волутин като резервни вещества.



**Таблица 4.** Морфологични характеристики на изолатите.

| Изолат | Форма на клетките | Размери, $\mu\text{m}$ | Грам | Спори | Капсула | Подвижност | Волютин | Гранулеза | ПХБ |
|--------|-------------------|------------------------|------|-------|---------|------------|---------|-----------|-----|
| L-1    | Пръчки            | 1.1-5.0                | -    | -     | +       | +          | -       | -         | +   |
| L-2    | Пръчки            | 1.5-5.0                | -    | -     | -       | +          | -       | -         | +   |
| L-3    | Пръчки            | 2.3-8.5                | -    | -     | -       | +          | -       | -         | +   |
| L-4    | Пръчки            | 1.2-3.5                | -    | -     | +       | +          | -       | -         | +   |
| L-5    | Пръчки            | 1.0-3.6                | -    | -     | -       | +          | -       | -         | +   |
| L-6    | Пръчки            | 1.0-5.5                | -    | -     | -       | +          | -       | -         | +   |
| L-7    | Пръчки            | 6.0-10.0               | -    | -     | -       | +          | -       | -         | +   |
| L-8    | Пръчки            | 6.0-10.0               | -    | -     | +       | +          | -       | -         | +   |
| L-9    | Пръчки            | 1.5-5.0                | -    | -     | -       | +          | -       | -         | +   |
| L-10   | Пръчки            | 6.0-10.0               | -    | -     | -       | +          | -       | -         | +   |
| L-11   | Пръчки            | 1.5-5.0                | -    | -     | +       | +          | -       | -         | +   |
| L-12   | Пръчки            | 6.0-10.0               | -    | -     | -       | +          | -       | -         | +   |
| L-13   | Пръчки            | 1.5-5.0                | -    | -     | +       | +          | -       | -         | +   |
| L-14   | Пръчки            | 1.5-5.0                | -    | -     | -       | +          | -       | -         | +   |
| L-15   | Пръчки            | 6.0-10.0               | -    | -     | +       | +          | -       | -         | -   |
| L-16   | Пръчки            | 1.5-5.0                | -    | -     | +       | +          | -       | -         | -   |
| L-17   | Пръчки            | 1.5-5.0                | -    | -     | +       | +          | -       | -         | -   |
| L-18   | Пръчки            | 1.5-5.0                | -    | -     | -       | +          | -       | -         | -   |
| L-19   | Пръчки            | 6.0-10.0               | -    | -     | +       | +          | -       | -         | -   |
| L-20   | Пръчки            | 1.5-5.0                | -    | -     | +       | +          | -       | -         | -   |
| L-21   | Пръчки            | 6.0-10.0               | -    | -     | -       | +          | -       | -         | -   |
| L-22   | Пръчки            | 6.0-10.0               | -    | -     | -       | +          | -       | -         | -   |

Част от изолатите (L-1, L-4, L-8, L-11, L-14, L-15, L-17, L-18) формират значителни по размери капсули при култивиране на среди с глюкоза. При останалите щамове не е установено наличие на капсули при същите условия на култивиране, което потвърждава данните за вариабилността на този признак при неутрофилните железобактерии и несигурността на този признак като таксономичен критерий при тях.

Изолатите образуват различни по размери верижки. При обстойния електронно-микроскопски анализ (СЕМ) не са намерени фалшиви (лъжливи) разклонения на филаментите, за които има данни при някои от видовете на род *Leptothrix*.

При всички щамове е установено, че повърхността на клетките не е гладка, има различни филаментозни структури с различна дължина, вероятно с белтъчна природа.

Анализът на резултатите от изследването за източниците на въглерод показва, че всички изолати могат да усвояват захари – предимно глюкоза и вероятно това е предпочитания въглероден източник за тези бактерии. Също така, изолатите усвояват ацетати и пирувати. Тези резултати са потвърждение на данни в литературата, че бактериите от този род се развиват добре на среди със захари и органични киселини (Sawayama et al., 2011).

Температурният диапазон, отношението към рН и други съществени физиологични характеристики са посочени в Табл. 5.

**Таблица 5.** Физиологични характеристики на изолатите.

| Изолат | Анаеробен растеж | T, °C диапазон | Опт. T, °C | pH диапазон | Опт. pH | NaCl 1% | NaCl 3.5 % |
|--------|------------------|----------------|------------|-------------|---------|---------|------------|
| L-1    | -                | 10.0 – 28.0    | 25.0       | 6.8 – 7.2   | 6.70    | +       | -          |
| L-2    | -                | 10.0 – 28.0    | 25.0       | 6.8 – 7.8   | 6.70    | +       | -          |
| L-3    | -                | 10.0 – 28.0    | 25.0       | 6.8 – 7.8   | 6.70    | +       | -          |
| L-4    | -                | 5.0 – 18.0     | 20.0       | 6.5 – 8.0   | 7.00    | +       | -          |
| L-5    | -                | 5.0 – 20.0     | 20.0       | 6.8 – 7.8   | 7.00    | +       | -          |
| L-6    | -                | 10.0 – 28.0    | 25.0       | 6.5 – 8.0   | 7.00    | +       | -          |
| L-7    | -                | 10.0 – 28.0    | 25.0       | 6.8 – 7.2   | 6.70    | +       | -          |
| L-8    | -                | 10.0 – 28.0    | 25.0       | 6.8 – 7.8   | 7.00    | +       | -          |
| L-9    | -                | 10.0 – 28.0    | 25.0       | 6.8 – 7.8   | 6.80    | +       | -          |
| L-10   | -                | 5.0 – 20.0     | 15.0       | 6.8 – 7.8   | 6.80    | +       | +          |
| L-11   | -                | 10.0 – 30.0    | 15.0       | 6.8 – 7.2   | 7.00    | +       | +          |
| L-12   | -                | 10.0 – 28.0    | 25.0       | 6.8 – 7.8   | 6.80    | +       | -          |
| L-13   | -                | 10.0 – 28.0    | 25.0       | 6.8 – 7.2   | 6.70    | +       | -          |
| L-14   | -                | 5.0 – 20.0     | 15.0       | 6.5 – 8.0   | 7.00    | +       | -          |
| L-15   | -                | 10.0 – 30.0    | 25.0       | 6.5 – 8.0   | 7.00    | -       | -          |
| L-16   | -                | 10.0 – 30.0    | 25.0       | 6.8 – 7.8   | 7.10    | -       | -          |
| L-17   | -                | 5.0 – 20.0     | 15.0       | 6.5 – 8.0   | 7.00    | -       | -          |
| L-18   | -                | 5.0 – 30.0     | 15.0       | 6.5 – 8.0   | 7.10    | -       | -          |
| L-19   | -                | 10.0 – 30.0    | 15.0       | 6.8 – 7.8   | 6.80    | -       | -          |
| L-20   | -                | 5.0 – 20.0     | 15.0       | 6.5 – 8.0   | 7.00    | +       | -          |
| L-21   | -                | 10.0 – 28.0    | 25.0       | 6.8 – 7.8   | 7.00    | +       | -          |
| L-22   | -                | 5.0 – 20.0     | 15.0       | 6.8 – 7.8   | 6.80    | +       | -          |

**Легенда:** (+) – наличие на растеж; (-) – отсъствие на растеж

Анализът на резултатите показва следните характеристики на изследваните изолати:

- ⇒ Всички изследвани шамове са с тесен температурен диапазон.
- ⇒ Оптималната температура за преобладаващата част от тях е 25°C.
- ⇒ Една група изолати (L-4, L-6, L-10, L-14, L-17, L-18, L-20 и L-22) има диапазон, типичен за психрофилните микроорганизми.
- ⇒ Всички изследвани шамове са с тесен рН диапазон като оптималното рН е в границите 6.7 – 7.1.
- ⇒ Изолатите се развиват при концентрация на NaCl 1%, някои от изолатите (L-15, L-16, L-17, L-18 и L-19) изискват NaCl < 1%. Два изолата могат да се класифицират като халофилни (развиват се при 3.5% NaCl).

Получените данни са анализирани по таксономичните схеми, съгласно Определителя на Бърджи и резултатите показват, че изолатите могат да се групират в четири групи, а именно:

- ⇒ Седем изолата (L-7, L-8, L-11, L-13, L-16, L-17, L-20) проявяват свойства, сходни с вида *L. mobilis*
- ⇒ Шест изолата (L-1, L-2, L-6, L-11, L-15, L-21) са сходни с вида *L. cholodnii*
- ⇒ Пет изолата (L-3, L-4, L-7, L-12, L-14) са сходни с вида *L. discophora*
- ⇒ Четири изолата (L-5, L-18, L-19, L-22) проявяват характеристики, които не позволяват да бъдат отнесени към нито един от описаните в определителя видове.

На базата на проведените анализи с оптимизираните таксономични схеми може да се заключи, че изолатите принадлежат към род *Leptothrix*. За идентификация до вид са проведени и допълнителни анализи, включващи видово диференциращи признаци. На базата на получените резултати някои от изолатите са определени до вид, но друга част от тях се различават от описаните диференциращи признаци за отделните видове. Тъй като таксономичното описание на видовете не е пълно, има вероятност това да са щамове, които да принадлежат към неописани нови видове на рода. За потвърждаване на това, обаче са необходими допълнителни изследвания. Освен това, диференциращите видови характеристики се считат за едни от най-вариабилните фенотипни характеристики за рода и често водят до неправилни изводи (Phaup, 1968; Spring et al., 1996; Ghiorse et al., 1999; Siering & Ghiorse, 1996).

Съществен проблем при идентификацията на бактериите от този род е и загубата на типовите щамове за повечето видове в световните колекции. Опитите ни да получим типови щамове за сравнение при идентификацията се оказаха неуспешни. Предлагат се неотипове, за които липсва достатъчна таксономична информация. Това е причината да се дискутира таксономичния статус на рода и видовете, включени в него.

Резултатите също така потвърждават и становището, че при тези бактерии е задължително прилагането на методи на полифазната таксономия както по отношение на родовото диференциране, така и по отношение на видовата принадлежност (Spring et al., 1996; Pellegrin et al., 1999), а най-сигурното видово диференциране е чрез изолация на ДНК, получаване на добри PCR продукти и секвениране. Това становище се затвърждава в последните години (Siering & Ghiorse, 1997; Sawayama et al., 2011; Takada et al., 2012; Kunoh et al., 2016).

## **6. Молекулни методи за идентификация на изолатите**

### **6.1. Изолиране на тотална ДНК и провеждане на агарозна гел електрофореза**

От първоначално изолираните 22 чисти култури са избрани 12 щамове (L-1, L-2, L-4, L-6, L-7, L-11, L-13, L-14, L-18, L-17, L-19, L-21), които образуват по-голямо количество биомаса, за да могат да бъдат изолирани ДНК-и с достатъчно количество и качество за провеждане на молекулните методи. Клетъчното депо от тях е третирано съгласно

протокола за изолиране, приложен към Genomic Prep Mini Spin Kit. Количеството на тоталната ДНК, изолирана от щамовете е от 23,7 до 38,2 µg/µl. Електрофоретичният профил на тоталната ДНК демонстрира качеството на изолираната матрица. От получените резултати следва, че изолираната ДНК е с качество и количество, позволяващи последващото ѝ използване за 16S рДНК PCR.

## **6.2. Потвърждаване на таксономичната принадлежност на изолатите чрез PCR анализ**

За потвърждаване на таксономичната принадлежност на изолатите към род *Leptothrix* е проведен конвенционален 16S рДНК PCR анализ.

### **⇒ Избор на подходяща генетична последователност**

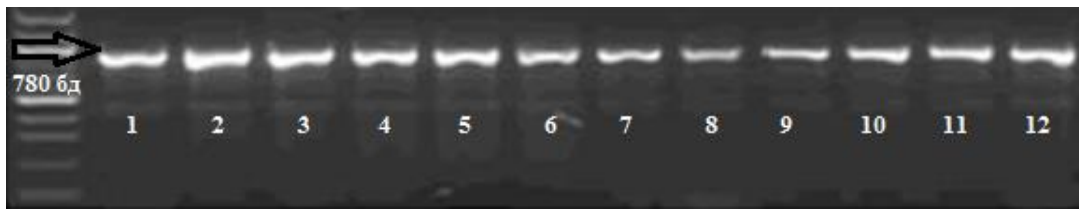
Използвана е публикувана в базата данни нуклеотидна секвенция на *mofA* оперона (+ фланкиращи гени) на род *Leptothrix* (GenBank № Z25774.3). Праймерните последователности са конструирани с помощта на специализиран софтуер (Primer-Blast). Съществен момент е избора на подходяща генетична последователност, позволяваща адекватна родова детекция на бактерии от рода. За осъществяване на зададената цел детайлно са анализирани голям брой публикувани генетични секвенции. Изборът на конкретния таргетен участък е детерминиран от целевата специфичност на детекцията. Поради доказаната си консервативност, като основна генетична мишена е използвана *mofA* секвенцията, кодираща синтеза на протеин, ангажиран в процесите на окисление на манган.

За потвърждаване на таксономичната принадлежност на изолатите към род *Leptothrix* е проведен 16S рДНК PCR анализ и с универсални бактериални праймери, използвайки праймерната двойка 27F – 1492R-2.

### **⇒ 16S рДНК PCR анализ с родово специфични праймери**

PCR анализ за потвърждаване на таксономичната принадлежност на изолатите към род *Leptothrix* е проведен с изолираната ДНК матрица. За оптимизиране на PCR анализа са изпробвани различни варианти за провеждане на PCR реакциите – чрез приготвяне на мастър микс и чрез готов за употреба Ready-To-Go PCR кит (GE Healthcare). Правени са вариации в съотношението на количествата на компонентите и на количеството ДНК и е използван вариантът с най-добри резултати.

Наличието на PCR продуктите е проверено чрез агарозна гел-електрофореза (3%), визуализацията на бандовете е извършена с използването на етидиев бромид (3µl) под UV светлина. При всичките дванадесет изследвани щама се позитивира продукт с големина 781 бд, отговарящ на очаквания (Фиг. 5).

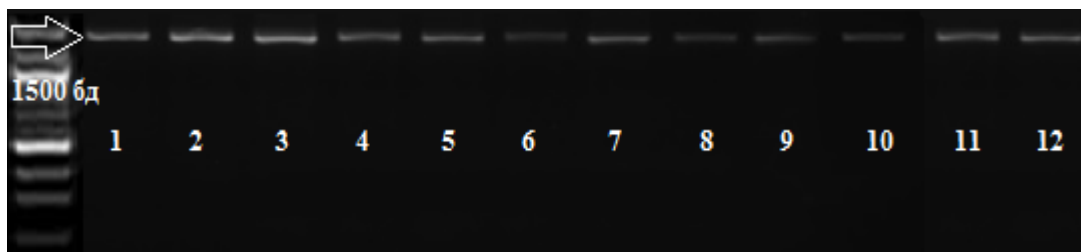


**Фигура 5.** Амплификационен профил на *mofA* - PCR.

Получените резултати потвърждават, че избраните праймери са достатъчно информативни за детекция на бактериите от род *Leptothrix*. Освен това, този тип PCR дава възможност за доказване на бактериите от рода в комплексни проби.

### ⇒16S рДНК PCR анализ с универсални праймери

Проведеният PCR с универсални бактериални праймери, демонстрира амплификацията на базов фрагмент със средна големина 1500 базови двойки при всички изследвани изолати. Резултатите са представени на Фиг. 6.



**Фигура 6.** Електрофоретичен анализ на PCR продуктите, получени при амплификация на 16S рДНК (праймери 27F – 1492R-2) в 1.5% агарозен гел: ДНК маркер (100 bp); 1) L-1; 2) L-2; 3) L-4; 4) L-6; 5) L-7; 6) L-11; 7) L-13, 8) L-14; 9) L-18; 10) L-19.

В заключение може да се каже, че таксономичната принадлежност на изолатите към род *Leptothrix* е потвърдена чрез PCR анализ, посредством избрана нуклеотидна последователност (*mofA* секвенция), която е достатъчно информативна за тяхното потвърждаване. Използваният PCR-базиран метод с използване на универсални еубактериални праймери също може да бъде използван при бактериите от този род.

Оптимизирането на протоколите за PCR анализа, отчитащо специфичните условия на култивиране на бактериите е подходящо за получаване на PCR продукти с качество, позволяващо тяхното секвениране. За потвърждаване на принадлежността на изолатите към род *Leptothrix* и установяване на видовото разнообразие, получените PCR продукти са изпратени за секвениране.

### **6.3. Секвениране на PCR-продукти на 16S рДНК и биоинформатичен анализ на получените секвенции**

Понастоящем за най-пълно и точно описание и типичане на неизвестен вид микроорганизъм, приоритет имат подходите, които съчетават в себе си класическата

схема за идентификация, наред с молекулно-генетичните методи.

С цел потвърждаване на резултатите от класическата микробиологична схема за типирание на изолатите, както и за разкриване на степента на генетична хомоложност между тях, е осъществено успешно амплифициране на 16S рДНК от изследваните изолати. Амплифицираните PCR фрагменти предварително са пречистени с кит GeneMATRIX Basic (EURx Ltd) и изпратени за секвениране в Macrogen (Холандия).

Получените нуклеотидни секвенции са подложени на секвенционен анализ. Големината на секвенираните участъци е представена в Табл. 6.

**Таблица 6.** Големина на фрагментите, подложени на секвенционен анализ.

| Брой бази, получени след проведеното секвениране |      |      |      |
|--|------|------|------|
| L-1  | 1442 | L-13 | 1413 |
| L-2  | 1411 | L-14 | 1413 |
| L-4  | 1420 | L-17 | 1423 |
| L-6  | 1427 | L-18 | 1442 |
| L-7  | 1572 | L-19 | 1463 |
| L-11   | 1526 | L-21 | 1458 |

С помощта на специализиран софтуер (BLAST®) е установена генетичната идентичност на изследваните 16S рДНК фрагменти от всеки един изолат, спрямо типовия за вида *L. discophora* щам SS-1 (ATCC 43182). Резултатите са представени в Табл. 7.

**Таблица 7.** Генетична идентичност на секвенираните 16S рДНК фрагменти на изолатите.

| Изолат | Брой бази (бд) | Идентичност спрямо ATCC 43182 (%) | Изолат | Брой бази (бд) | Идентичност спрямо ATCC 23270 (%) |
|--------|----------------|-----------------------------------|--------|----------------|-----------------------------------|
| L-1    | 1442           | 88%                               | L-13   | 1413           | 83%                               |
| L-2    | 1411           | 82%                               | L-14   | 1413           | 87%                               |
| L-4    | 1420           | 80%                               | L-17   | 1423           | 84%                               |
| L-6    | 1427           | 89%                               | L-18   | 1442           | 89%                               |
| L-7    | 1572           | 86%                               | L-19   | 1463           | 83%                               |
| L-11   | 1526           | 89%                               | L-21   | 1458           | 86%                               |

За съжаление, проведеният биоинформатичен анализ с помощта на специализиран софтуер (BLAST), не доведе до категоричен резултат относно потвърждаване на таксономичния статус на изолатите.

#### **V.6.4. Провеждане на рестрикционен анализ (RFLP)**

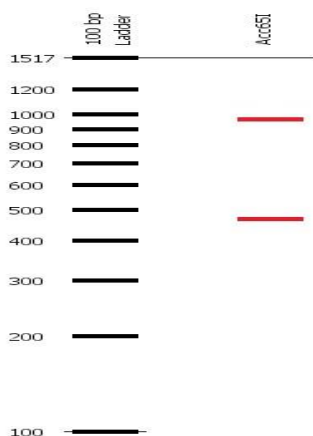
Проведеният RFLP анализ на 16S рДНК фрагмент, включва 12 от щамове (L-1, L-2, L-4, L-6, L-7, L-11, L-13, L-14, L-17, L-18, L-19 и L-21), определени като *Leptothrix* sp.

Преди осъществяването на самата рестрикция, получените предварително секвенции на съответните изолати са подложени на биоинформатичен анализ, целящ определяне на предполагаемите рестрикционни профили при използване на съответните рестриктази (*Hae III*, *Alu I*, *Acc65I*), както и големината на отделните фрагменти. След провеждане на анализа, рестрикционни профили са получени единствено с рестриктаза *Acc65I*.

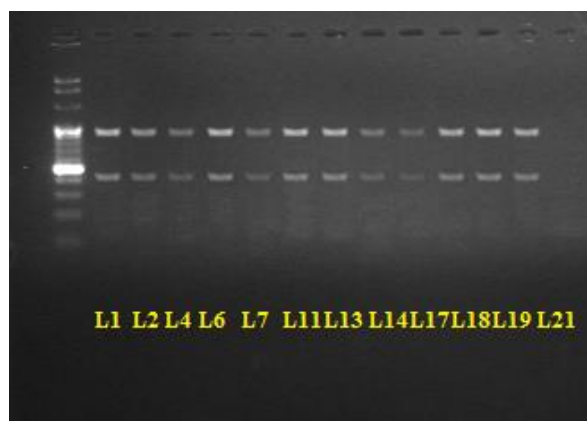
⇒ **Рестрикция с *Acc65I*** - с цел установяване на дискриминативния потенциал на RFLP методологията, амплифицираните 16S рДНК фрагменти от изследваните изолати са подложени на рестрикция, включваща използването на рестрикционния ензим – *Acc65I* (място на разпознаване G/GTACC).

Чрез използване на съответния софтуерен пакет (CodonCode™), въведените секвенции генерират следния рестрикционен профил, представен на Фиг. 7.

Наблюдава се еднакъв предполагаем рестрикционен профил при 16S рДНК секвенциите на всички изолати, таксономично определени към род *Leptothrix* (Фиг. 8).



**Фигура 7.** Софтуерно генериран рестрикционен профил (ензим *Acc65I*).



**Фигура 8.** 16S рДНК RFLP профил с ензим *Acc65I*.

Не е установена разлика с генерирания RFLP профил на типовия за вида *Leptothrix discophora* щам SS-1 (GenBank № L33975.1) при използването на рестриктаза *Acc65I*. Въпреки положителните резултати от RFLP анализа, на настоящия етап тези резултати не могат да се приемат като напълно достоверни, тъй като анализът е проведен само с три рестриктази, като при две от тях не е получен рестрикционен профил. До аналогични заключения достигат и други автори, правили опити за изучаване на вътревидовото разнообразие на щамове от рода (Fleming et al., 2011; Sawayama et al., 2011; Emerson et al., 2010; Emerson & Ghiorse, 1992). Като основна причина се считат именно противоречивите данни за типовите щамове, както и затрудненията при

анализирането и сравняването на наличните данни с използването на различни типове щамове за един и същи вид.

## **7. Условия на култивиране за получаване на калъфи в лабораторни условия. Анализ на калъфите – структура и химичен състав**

### **7.1. Култивиране на бактериите от род *Leptothrix* за получаване на калъфи в лабораторни условия**

След култивиране на бактериите от род *Leptothrix* в различни хранителни среди и типове на култивиране, калъфи са получени единствено в среда SIGP. Резултатите показват, че средата е добре балансирана и не се наблюдават сериозни отклонения в стойностите на рН, характерни за култивирането на описаните по-горе хранителни среди. Това потвърждава още веднъж, че буферирането (в случая добавянето на HEPES) е задължително за успешното култивиране.

Измененията в концентрациите на феройоните също заслужават специално внимание. Скоростта на химичното окисление на феройоните е незначително до края на експеримента. Лаг-фазата при култивиране на тази среда е с продължителност около 90 ч., а след 14-ия ден на култивиране културата е практически в стационарна фаза на развитие. Това е и основната причина, поради която в края на култивирането калъфните структури се разпадат и практически изчезват. Следователно, ако целта е получаване на калъфни структури, то култивирането трябва да е с продължителност максимум 30 дни.

### **7.2. Анализ на калъфите – структура и химичен състав**

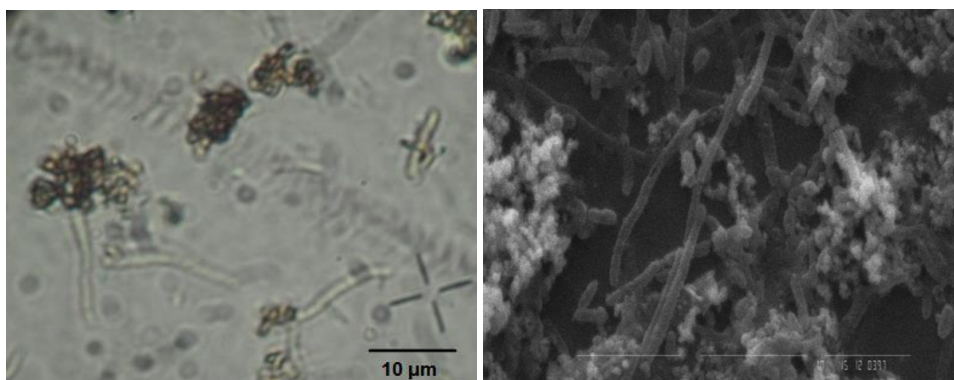
SEM анализите разкриват структурата на калъфите, получени в лабораторни условия и основните им неорганични елементи SEM/EDX (Фиг. 9), подобно на предишни доклади (Hallbeck et al., 1993; Romano and Peloquin, 1963).

Култивирането на *Leptothrix* sp. в среда SIGP води до увеличаване на пухкавите, охрени отлагания в колбите, главно върху железните стружки и предметните стъкла.

В началния етап на образуване на калъфи, тръбните структури са по-тънки и по-къси. Приблизително от 7 до 24 ден от култивирането се наблюдава изобилие от калъфни структури. След този период от време броят им постепенно намалява. Структурите се разпадат напълно до края на култивирането, когато не се прибавя допълнително свежа среда и източник на желязо.

Светлинна микроскопия и SEM разкриха, че средния размер на формираните калъфи е около 7-10  $\mu\text{m}$  и среден диаметър до 1  $\mu\text{m}$  (Фиг. 10). Калъфните структури са крехки и чупливи (Sawayama et al., 2011, Spring et al., 2006) и следователно, всякакви измервания на дължината на тези структури не могат да бъдат достоверни.





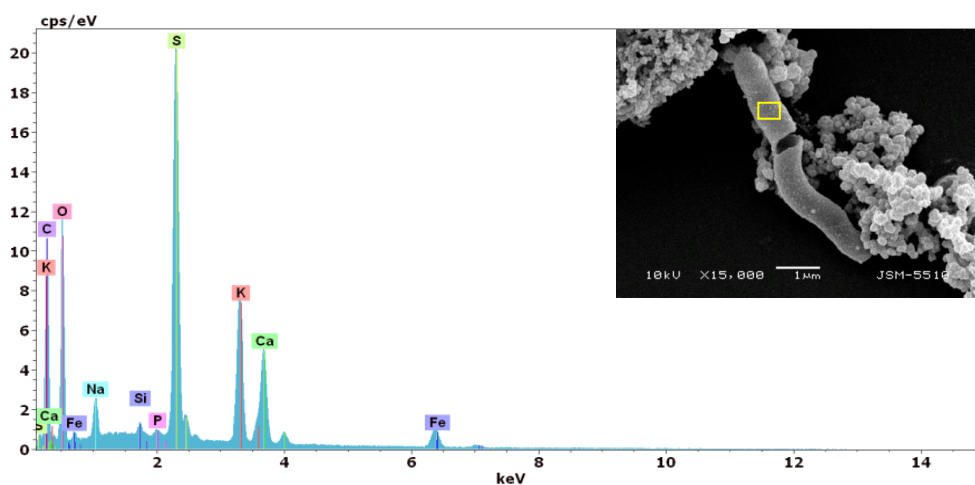
а)

б)

**Фигура 10.** а) Светлинна микроскопия на калъфни структури след 7-дневен период на култивиране; б) SEM на добре оформени калъфни структури след 7-дневен период на култивиране: увеличение  $\times 3500$ , размерна скала = 10  $\mu\text{m}$ .

Данните от XRD показват, че желязо-съдържащите продукти върху калъфите имат монофазен състав (лепидокроцит -  $\gamma\text{-FeOOH}$ ), както и че размера на желязните частици е 8 nm. Игло-подобната форма на биогенните наночастици е разкрита чрез TEM.

Чрез SEM/EDX анализ е установено, че S, O, C, K, Ca, Na, Si, Fe и P са неорганичните елементи на зрелите калъфни структури, получени в лабораторни условия (Фиг. 9).



**Фигура 9.** Елементен SEM/EDX анализ на калъфите на *Leptothrix* sp.

## 8. Определяне на растежните параметри на изолираните щамове. Култивиране върху избрани течни хранителни среди и изследване динамиката на окисление на феройоните и измененията на рН

Тези изследвания са проведени, поради необходимостта да се проверят следните параметри, съществени за получаването на биогенни оксиди:

- ⇒ Продължителност на култивирането с цел оптимизиране на процеса
- ⇒ Изменения на рН в процеса на култивиране и ефект на тези промени върху образуваните оксиди/хидроксиди
- ⇒ Динамиката на окисление на феройоните и ефект върху развитието на щамовете
- ⇒ Потвърждаване на олиготрофния характер на бактериите при култивиране на среда на Лиске

⇒ Проследяване на ефекта на типа на култивиране върху развитието на бактериите и образуваните оксиди/хидроксиди.

Изследванията са проведени с щам L-2. Този щам е избран, тъй като той образува най-бързо и най-добре оформени калъфни структури при култивиране в лабораторни условия.

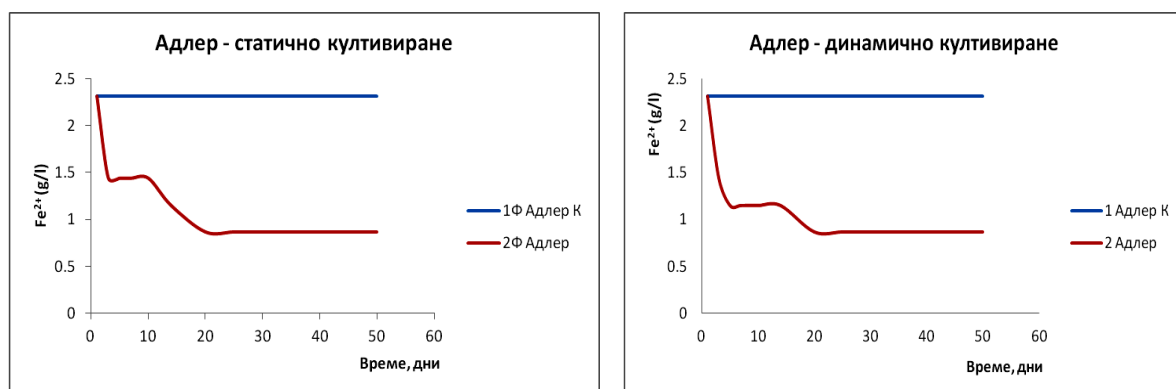
Използвани са средите: Лиске, Адлер и SIGP. За проследяване на влиянието на добавянето на железни стружки в средите, количеството на източника на феройони, както и типа на водната фаза (дестилирана вода и водопроводна вода) са използвани следните варианти:

- ⇒ Адлер с добавяне на железни стружки
- ⇒ Адлер без добавяне на железни стружки
- ⇒ SIGP с железни стружки
- ⇒ SIGP без железни стружки
- ⇒ Лиске с водопроводна вода (vH<sub>2</sub>O) + 4 г/л FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O
- ⇒ Лиске с водопроводна вода (vH<sub>2</sub>O) + 8 г/л FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O
- ⇒ Лиске с водопроводна вода (vH<sub>2</sub>O) без FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O
- ⇒ Лиске с водопроводна вода (vH<sub>2</sub>O) без FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O и без железни стружки
- ⇒ Лиске с дестилирана вода (dH<sub>2</sub>O) + 4 г/л FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O
- ⇒ Лиске с дестилирана вода (dH<sub>2</sub>O) + 8 г/л FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O
- ⇒ Лиске с дестилирана вода (dH<sub>2</sub>O) без FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O
- ⇒ Лиске с дестилирана вода (dH<sub>2</sub>O) без FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O и без железни стружки

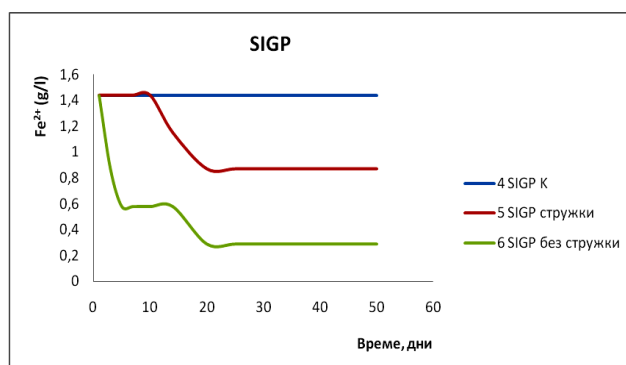
За всеки вариант на посочените среди са залагани и стерилни контроли.

Култивирането е извършено при 20°C и рН около неутралното при статични и динамични условия. Статичното култивиране е осъществено в колби на Ференбах, а динамичното на клатачен апарат при 70 об./мин. в Ерленмайерови колби. Проведен е детайлен микроскопски анализ – светлинна и сканираща електронна микроскопия.

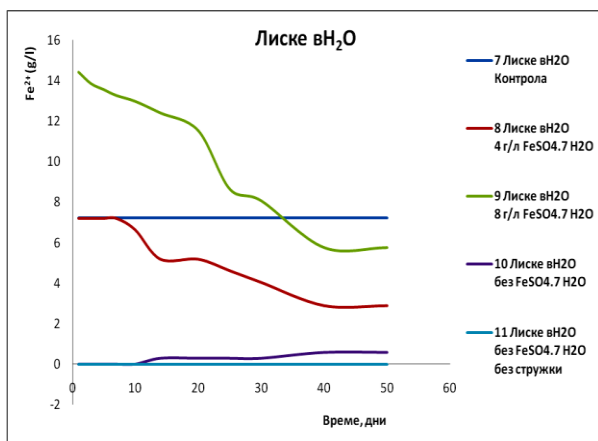
Резултатите от проведените изследвания са показани на Фиг. 11 – 16.



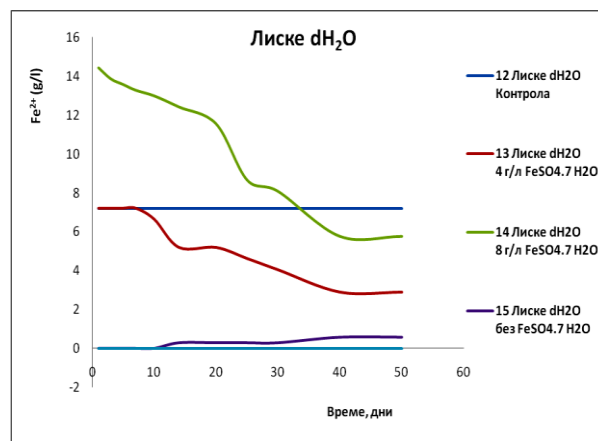
**Фигура 11.** Динамика на окисление на Fe<sup>2+</sup> при култивиране на щам L-2 на среда на Адлер.



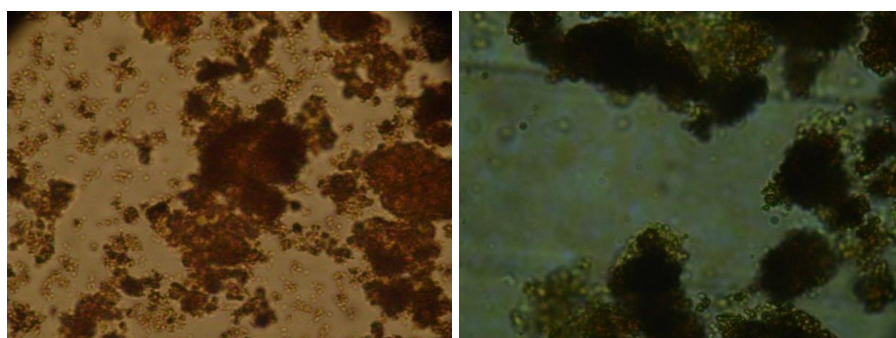
Фигура 12. Динамика на окисление на  $Fe^{2+}$  при култивиране на щам L-2 на среда SIGP.



Фигура 13. Динамика на окисление на  $Fe^{2+}$  при статично култивиране на щам L-2 на среда Лиске с различни концентрации на феройони и водопроводна вода.



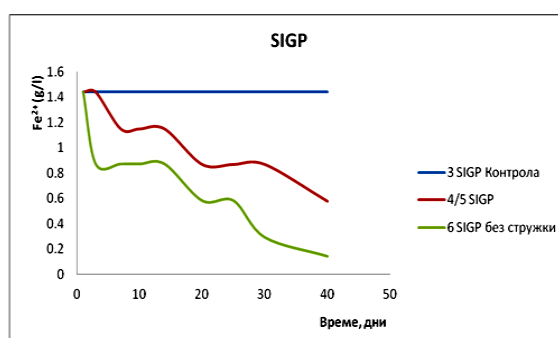
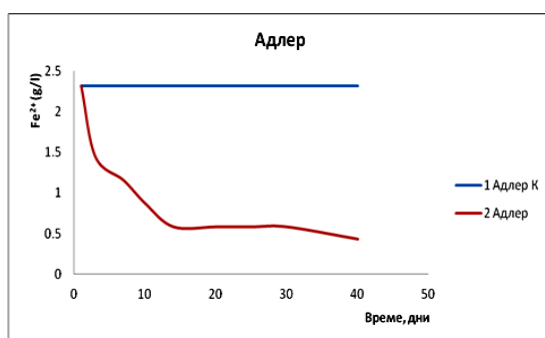
Фигура 14. Динамика на окисление на  $Fe^{2+}$  при статично култивиране на щам L-2 на среда Лиске с различни концентрации на феройони и дестилирана вода.



а)

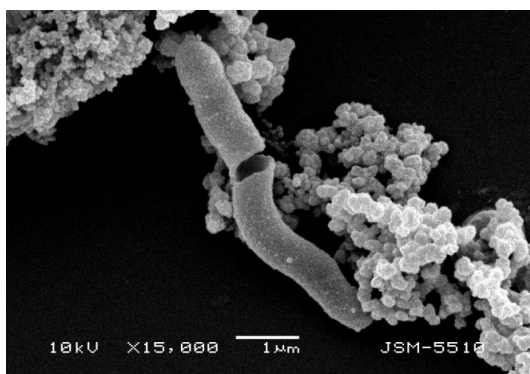
б)

Фигура 15. Светлинно-микроскопска картина при култивиране на щам L-2: а) статично култивиране на среда на Лиске; б) динамично култивиране на среда на Адлер.



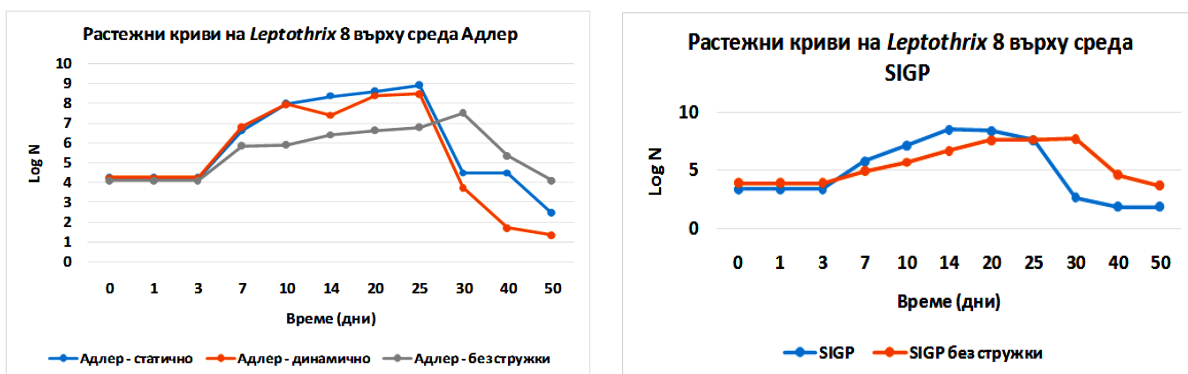
Фигура 16. Динамика на окисление на феройоните в процеса на динамично култивиране на щам L-2 в среда Адлер и SIGP.

Единствено при култивиране на среда SIGP се установяват калъфни структури (Фиг. 17). Калъфите, получени в лабораторни условия са сравнени с тези, взети от потоците от планина Витоша (референтни проби), сравнявайки ги чрез сканираща електронна микроскопия (Фиг. 3). В референтните проби се установяват такива структури, като по-голямата част от тях са празни – не съдържат бактерии и тяхната структура напълно отговаря на описанията, дадени от други автори (Ellis, 2003; Sawayama et al., 2011).

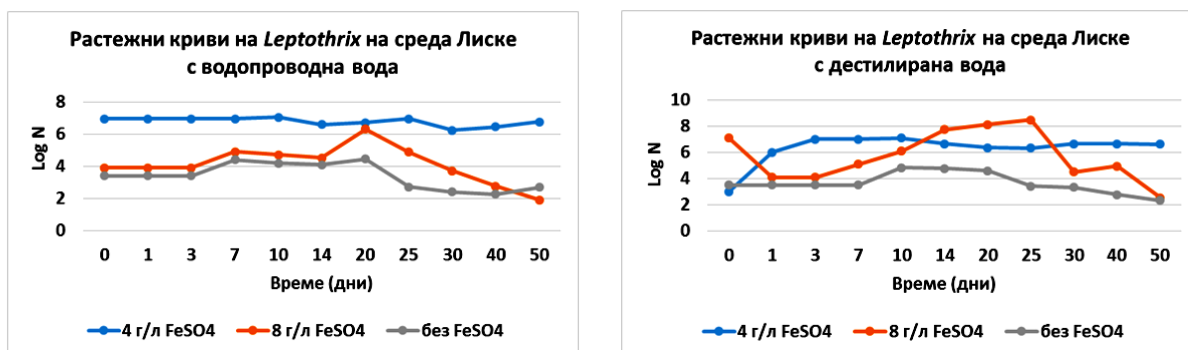


**Фигура 17.** Сканираща електронна микроскопия на проба от хранителна среда SIGP на шам L-2 при динамично култивиране.

Растежните криви на шам L-2 при култивиране на различните хранителни среди са посочени на Фиг. 18 и 19.



**Фигура 18.** Растежни криви на шам L-2 при култивиране в среда на Адлер и SIGP.



**Фигура 19.** Растежни криви на шам L-2 при култивиране на различни варианти на среда Лиске.

Резултатите от проведените изследвания позволяват да се направят няколко по-съществени изводи:

⇒ За средите на Лиске и Адлер е необходимо добавянето на желязни стружки за развитието на бактериите.

⇒ По-добрият вариант при приготвянето на тези среди е използването на водопроводна вода.

⇒ Към средата на Лиске трябва да се добавя допълнителен въглероден източник за оптимизиране развитието на бактериите.

⇒ Измененията в рН на средата в процеса на култивирането са в установените граници на рН диапазона на бактериите и не се отразяват върху тяхното развитие.

⇒ Окислението на феройните е интензивно след 2-ия ден от развитието на културата и в края на култивационния период количеството им е незначително.

⇒ Химическото окисление на феройните е незначително до края на култивирането.

⇒ По-ефикасният начин на култивиране за получаване на биогенни оксиди е статичното култивиране.

⇒ Периодът на култивиране може да бъде съкратен до 20 дни, тъй като след този период количеството на феройните е незначително.

⇒ Единствено при култивиране на среда SIGP се наблюдава образуване на тръбовидни структури, които твърде лесно се разрушават и в края на култивирането са практически разрушени.

Проведените изследвания потвърждават, че използваните хранителни среди са правилно подбрани и могат да бъдат използвани за получаване на по-големи количества биомаса.

На базата на резултатите, получени при изследване динамиката на окисление на феройните и данните от морфологията на бактериите е определен оптималния период на култивиране на бактериите за получаване на достатъчно количество материал за анализ на свойствата на образуваните оксиди (40-50 дни). След този период настъпват изменения в рН на средата, като при някои от средите количеството на феройните е напълно изчерпано. Тази продължителност на култивиране се препоръчва в бъдещи изследвания.

Измененията в концентрациите на желязото са незначителни в контролните експерименти, което потвърждава схващането, че бактериите стимулират чрез продукти от метаболизма си окислението на желязото и образуването на неразтворими оксиди/хидроксиди.

## 9. Анализ на формираните железни оксиди/(окси)хидроксиди чрез различни физични методи

### 9.1. Рентгено-структурен анализ (XRD)

Данните от XRD анализа на проби от мястото на пробовземане и проби от среди на Адлер, ИССЛ, Лиске и SIGP показват, че се формират различни железни оксиди/(окси)хидроксиди в селектираните хранителни среди с участието на бактерии от род *Leptothrix* (щам L-2). Рентгено-структурният анализ показва, че получените желязо-оксидни частици имат размери от 8 до 30 nm. Резултатите са показани в Табл. 8, където се вижда, че преобладаващата фаза е тази на лепидокроцита.

Образците от биогенни фероксиди/(окси)хидроксиди съдържат обикновено органични остатъци и то предимно органичен въглерод. Shopska и сътр. (2013) дори смятат, че неорганичните съединения и органиката са едно цяло, т.е. биогенното желязо по природа е хибриден материал.

Таблица 8. Рентгено-структурен анализ за формираните железни оксиди/(окси)хидроксиди.

| Хранителни среди           | Тип на формираните оксиди/(окси)хидроксиди, тяхното процентно съотношение и размер на частиците  |
|----------------------------|--|
| Природен биогенен материал | ▶ гьотит ( $\alpha$ -FeOOH) – 100 % - 9 nm   |
| Адлер                      | ▶ лепидокроцит ( $\gamma$ -FeOOH) - 59.67 % - 29 nm<br>▶ магнетит ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) - 21.56 % - 24 nm<br>▶ гьотит ( $\alpha$ -FeOOH) - 18.77 % - 12 nm |
| ИССЛ                       | ▶ гьотит ( $\alpha$ -FeOOH) - 77.03 % - 10 nm<br>▶ лепидокроцит ( $\gamma$ -FeOOH) - 22.97 % - 28 nm   |
| Лиске                      | ▶ гьотит ( $\alpha$ -FeOOH) - 77.02 % - 10 nm<br>▶ лепидокроцит ( $\gamma$ -FeOOH) - 14.84 % - 28 nm<br>▶ магнетит ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) - 8.14 % - 27 nm  |
| SIGP                       | ▶ лепидокроцит ( $\gamma$ -FeOOH) – 100 % - 8 nm   |

Най-интересният оксид, получен при нашите изследвания е магнетита, поради повсеместното му разпространение и магнитни свойства. Затова са изследвани два типа наноразмерен магнетит, получен посредством химична технология – „съвместно утаяване“ (наноразмерни частици магнетит) (ИЕ-БАН), които по кристалохимични параметри са идентични с магнетита, получен по биотехнологичен път (хибриден наноструктуриран магнетит) (БФ-СУ). Материалът е синтезиран при стайна температура и условията са сравними с тези на използваната биотехнология.

Резултатите показват, че хибридният магнетит има параметър на кристалната клетка по-близък до този на обемен магнетит. Кислородният параметър е с незначителни отклонения, което означава, че процесите на повърхностно окисление при такива

наночастици са силно ограничени за разлика от наночастиците, получени посредством конвенционални химични технологии. Това прави биомагнетита отличен кандидат, заместващ получения по химичен път магнетит.

## 9.2. Раманова спектроскопия

Получените различни типове железни оксиди/(окси)хидроксици са характеризирани чрез Раманова спектроскопия. Резултатите от анализа са посочени в Табл. 9. Не са открити характеристични Раманови позиции, когато лазерният сноп е фокусиран върху чисто предметно стъкло без биофилм, което показва липса на смущения в спектъра от стъклото. По време на измерванията се наблюдава силен луминесцентен сигнал, присъстващ при всички проби, съдържащи железни оксиди/(окси)хидроксици, който силно затруднява изследването. Той се простира в рамките на целия спектрален диапазон (от 100 до 3400  $\text{cm}^{-1}$ ) на получените спектри. Такава луминесценция не се наблюдава в проби, които не съдържат съединения на желязото.

**Таблица 9.** Обобщени резултати от Рамановата спектроскопия.

| Хранителна среда (проба) | Раманови позиции на пиковете, открити в пробите* ( $\text{cm}^{-1}$ )  | Детектирани железни оксиди/хидроксици**  | Вид магнетизъм*** | Луминесценция (при 687 Раманова линия) | Източник на $\text{Fe}^{2+}$  |
|--------------------------|--|--|-------------------|--|---|
| ИССЛ (Ференбах)          | 146, 221, <b>253</b> , 310, 350, <b>380</b> , <b>531</b> , 650<br>220, <b>251</b> , <b>381</b> , <b>533</b>                      | лепидокроцит ( $\gamma\text{-FeO(OH)}$ ) | Антиферо магнитен | силна                                  | железни стружки, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$          |
| Лиске (Py)               | <b>304</b> , <b>395</b><br><b>250</b> , <b>304</b> , <b>392</b>  | гъотит ( $\alpha\text{-FeO(OH)}$ )       | Антиферо магнитен | силна                                  | железни стружки, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$          |
| ИССЛ (Py)                | 220, <b>253</b> , 312, 347, <b>380</b> , <b>531</b> , 650<br>221, <b>251</b> , 310, 350, <b>381</b> , <b>530</b> , 646           | лепидокроцит ( $\gamma\text{-FeO(OH)}$ ) | Антиферо магнитен | слаба                                  | железни стружки, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$          |
|                          | <b>301</b> , <b>394</b> , 480, 560, 680  | гъотит ( $\alpha\text{-FeO(OH)}$ )       | Антиферо магнитен |  |   |
| Адлер (Ференбах)         | 221, <b>254</b> , 312, 350, <b>381</b> , <b>465</b> , <b>530</b> , 650<br><b>252</b> , 347, <b>379</b> , <b>463</b> , <b>536</b> | лепидокроцит ( $\gamma\text{-FeO(OH)}$ ) | Антиферо магнитен | силна                                  | $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ |
|                          | <b>310</b> , <b>540</b> , <b>670</b><br><b>670</b>   | магнетит ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )     | Феримагнитен      |  |   |

\* Най-важните позиции в откритите Раманови сигнали са с удебелен шрифт.

\*\* Отнасянето на спектрите е въз основа на литературни данни (Bellot-Gurlet et al., 2009; Colombari, 2011; Das & Hendry, 2011; de Faria et al., 1997; Hanesch, 2009; Oh et al., 1998; Wang, 1998). Тъй като подобно Раманово изследване върху биогенен материал не е извършвано, се прави сравнение с данни за естествени и изкуствени минерали, корозионни продукти и др.

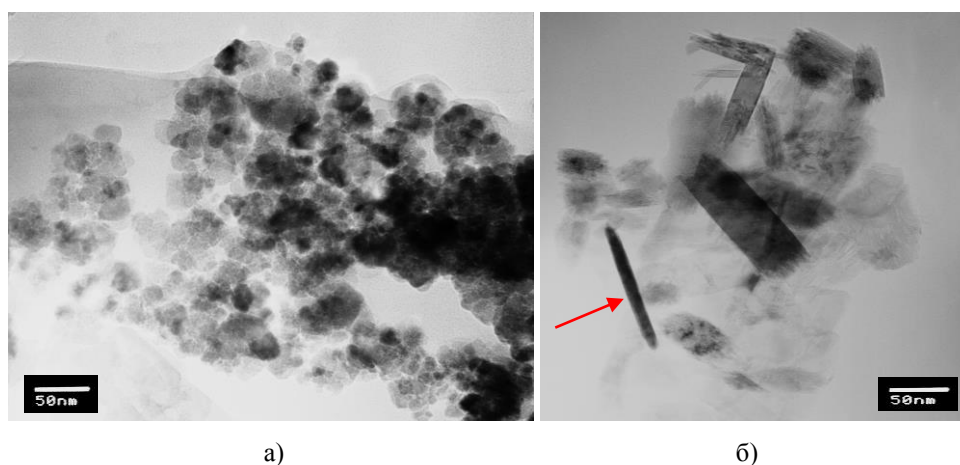
\*\*\* Типът магнетизъм има информативен характер и е въз основа на класическото възприемане за такива желязо-съдържащи съединения.



Рамановата спектроскопия е полезен инструмент в процеса на определяне на фазата, даваща ясна и недвусмислена информация за състоянието на желязото в материалите, получени биогенно. Този метод показва, че желязо(III) (окси)хидроксид е основна фаза, открита в биогенните материали – основно лепидокроцит ( $\gamma$ -FeO(OH)), само при образци от среда на Лиске е открит гьотит ( $\alpha$ -FeO(OH)). Освен двата идентифицирани (окси)хидроксида, е открит и магнетит в проба от хранителна среда на Адлер.

### 9.3. Трансмисионна електронна микроскопия (ТЕМ)

Получените биогенни прахове от средите Адлер, SIGP, Лиске и ИССЛ имат добре изградена кристална структура от фероксиди/оксихидроксида. Това се потвърди и с помощта на ТЕМ. На Фиг. 20 са показани кристалите от среда на Адлер.



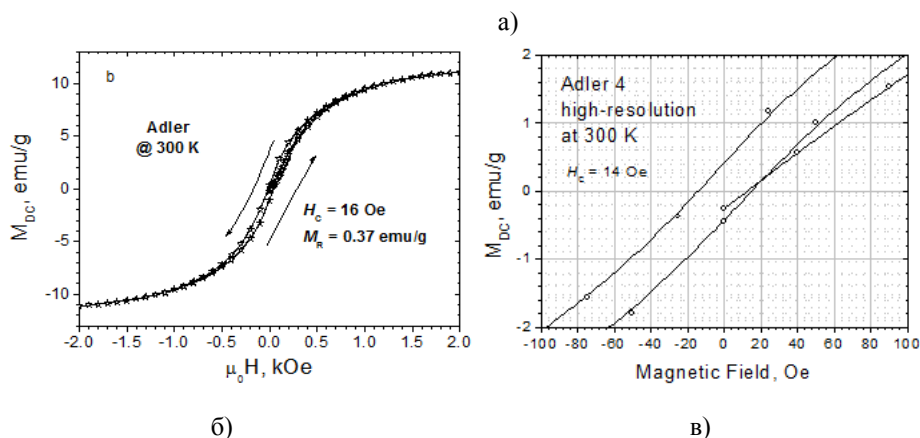
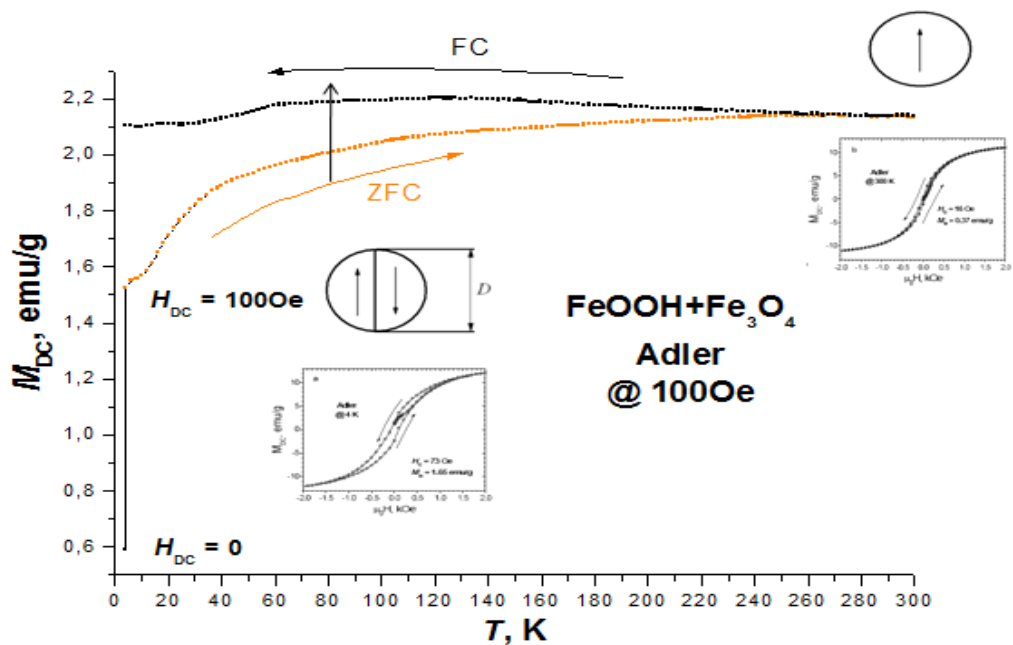
**Фигура 20.** ТЕМ на прахообразна проба от среда на Адлер: (а) наноразмерни частици със сферична форма, идентифицирани като магнетит и (б) игловидни кристали от оксихидроксида, идентифицирани като лепидокроцит, а със стрелка като гьотит.

Наблюдават се наноразмерни кристали от магнетит със среден диаметър от 10 до 30 nm, които са илюстрирани на Фиг. 20 а). На Фиг. 20 б) могат да се видят иглести кристали с диаметър от 20 до 50 nm, които са идентифицирани като лепидокроцит и такива с по-малък диаметър с дължина от порядъка 10 до 20 nm (на фигурата са посочени със стрелка), идентифицирани като гьотит.

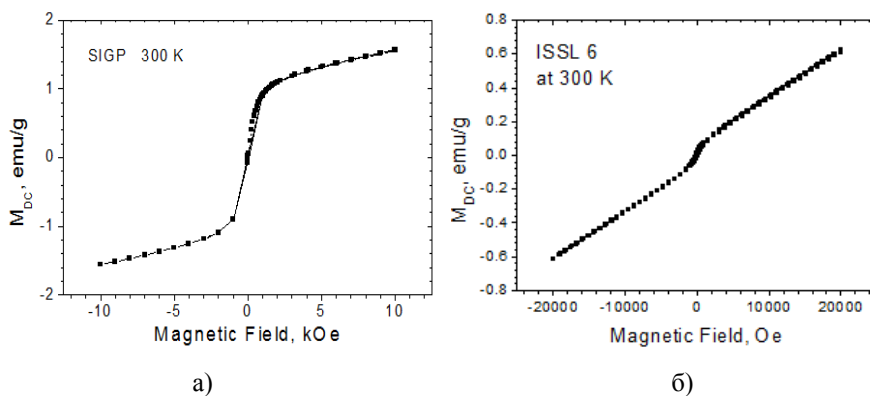
### 9.4. Магнитни измервания на получените оксиди/(окси)хидроксида посредством PPMS

Магнитните измервания, извършени чрез система за физическо измерване на свойствата (System Physical Property Measurement - PPMS) на проба от среда на Адлер показва суперпарамагнитно поведение (Фиг. 21), типично за магнетит, докато пробите от среди ИССЛ, Лиске и SIGP показват слабо магнитно поведение (Фиг. 22).





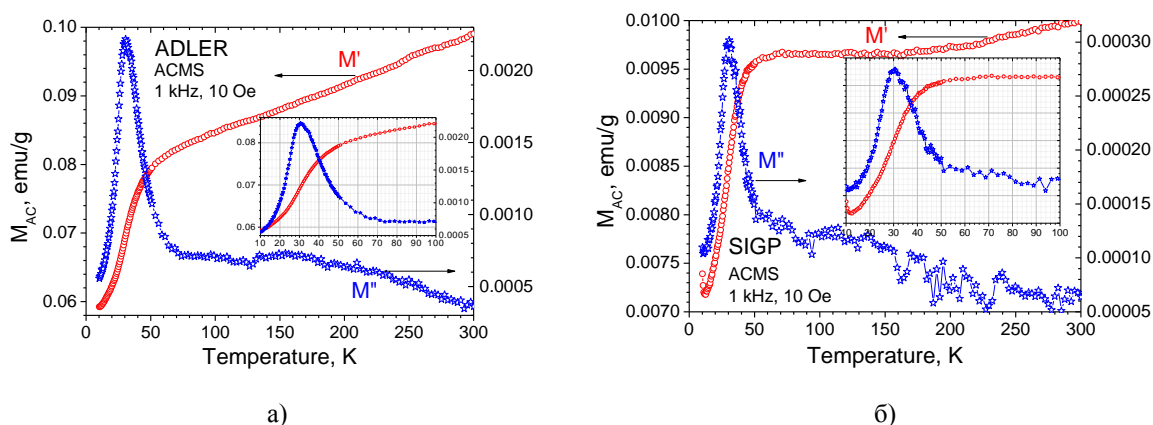
Фигура 21. Магнитна хистерезисна крива  $M(H)$  на проба от среда на Адлер при а) 4 К; б) и в) 300 К.



Фигура 22. Магнитна хистерезисна крива  $M(H)$  на проби от среди SIGP и ИССЛ при 300 К.

Особено внимание е отделено на прахообразни проби от среда на Адлер и проби с високо съдържание на биогенни калъфни структури от среда SIGP. Резултатите от магнитните измервания са илюстрирани на Фиг. 23. Изследването показва, че прахообразната проба от среда на Адлер (Фиг. 23 а)) има по-висока магнитна проницаемост, докато при пробата от среда SIGP (Фиг. 23 б)) се наблюдават добре

изразени антиферромагнитни свойства. Кристало-структурните изследвания, които са дискутирани по-горе, добре обясняват наблюдаваната разлика в магнитните свойства. Изследванията показват, че кальфните структури съдържат наноразмерни включения от лепидокроцит ( $\gamma\text{-FeOOH}$ ), който има добре изразени антиферромагнитни свойства, докато в прахообразната проба от среда на Адлер имаме основно лепидокроцит и по-малко магнетит ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), който е повлиял на магнитните свойства на материала и те са по-високи от тези на пробата от среда SIGP.

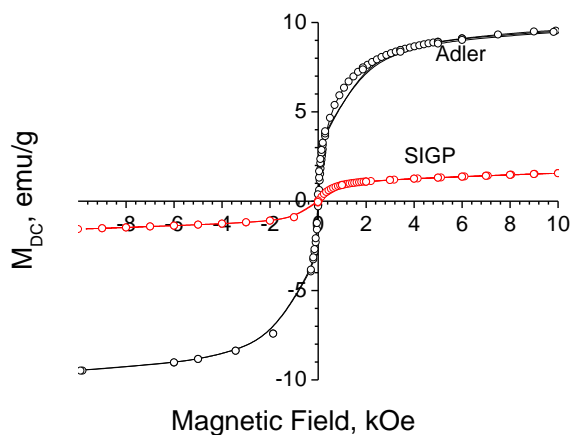


**Фигура 23.** Температурна зависимост на реалната и имагинерната част на комплексната магнитна проницаемост на проби от: а) среда на Адлер и б) среда SIGP при AC магнитно поле с честота 1 kHz и амплитуда 10 Oe.

Магнитният момент на проба от среда SIGP при температури 10–15 K има нелинейно нарастване. То е свързано с наноразмерността на частиците, вследствие на което може да се очаква силно нарушение на повърхностния слой на частиците в посока на образуване на магнетит. Този ефект може да се наблюдава само при много ниски температури, когато магнитните моменти са фиксирани, докато при високи температури вибрацията на магнитните моменти тушира този ефект. Наблюдаваната особеност в поведението на проба от среда SIGP разкрива нови възможности за експериментални изследвания и теоретична интерпретация на наблюдаваните процеси. Изследванията в импулсно магнитно поле потвърдиха наличието на преход на Вервей при прахообразния биогенен магнетит. От Фиг. 23 а) се вижда, че магнитните свойства видимо се изменят при 125 K. При тази температура магнетитът слабо променя кристалната си структура, но поради потискане на електронната делокализация силно се намалява проводимостта му.

Изследванията върху хистерезисните свойства при статични магнитни полета за двата материала са илюстрирани на Фиг. 24. При субпродукта, получен от среда на Адлер при стайна температура, се наблюдава безхистерезисна крива, типична за

наноразмерни магнитни частици и близка по намагнитеност на насищане до тази на обемния магнетит. При субпродукта, получен от среда SIGP има слабо изразен хистерезис с индикация за наноразмерност при стайна температура, който се свързва с повърхностните структурни изменения на дискретно диспергираните частици от лепидокроцит в органичната матрица на калъфите.



**Фигура 24.** Хистерезисни криви  $M(H)$  при 300 К и 10 kOe за проби от среди Адлер и SIGP.

В заключение от проведените магнитни измервания може да се обобщи, че изследването на магнитните свойства на формираните железни оксиди/хидроксида при култивирането на бактериите върху различни хранителни среди показва суперпарамагнитни свойства при стайна температура на магнетита и относително ниска намагнитеност, която се дължи на ефект на минерализация на повърхността на частиците. Този ефект при магнетита води до образуване на квазимагнетен слой на повърхността на магнетита и формирането на гъотит вследствие на полиморфната модификация на лепидокроцита. Необходими са допълнителни магнитни измервания, за да се разбере напълно магнитния характер на получените съединения.

### 9.5. Мьосбауерова спектроскопия (MöS)

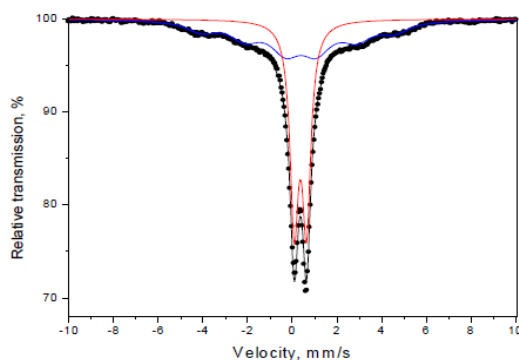
Резултатите от Мьосбауеровата спектроскопия на прахов биогенен образец от мястото на пробовземане и от среда на Лиске, ИССЛ, Адлер и SIGP са показани на Фиг. 25 – 27.

Спектрите, получени от природния биогенен материал се състоят от два типа гъотитни частици – суперпарамагнитни (дублет) и такива, подчинени на модела на колективно магнитно възбуждане (секстет). Определената стойност за магнитното поле (27.0) може да се разглежда като средна, поради значителната ширина на лините. В литературата се цитират стойности на магнитното поле на кристален гъотит от 38.2 Т. Намалването на стойностите на магнитното поле при стайна температура се свързва с

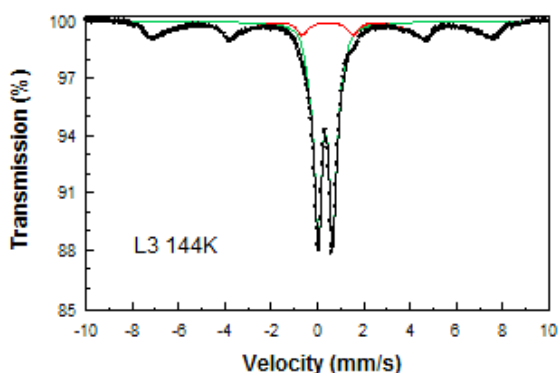
наличието на частици с малки размери, а също така, но в по-ниска степен, оказват влияние структурните дефекти и нестехиометричността. По-ниските стойности на квадруполното разцепване на секстетната компонента (-0.07 mm/s) в сравнение с цитираните в литературата за гьотит (-0.11 mm/s) също са резултат от суперпарамагнитната релаксация.

Спектрите, получени от среда на Адлер се състоят от дублетен компонент и секстет с дублет, наподобяващ лепидокроцитна фаза и възможност за суперпарамагнитен магнетит, секстетът е свързан с гьотит.

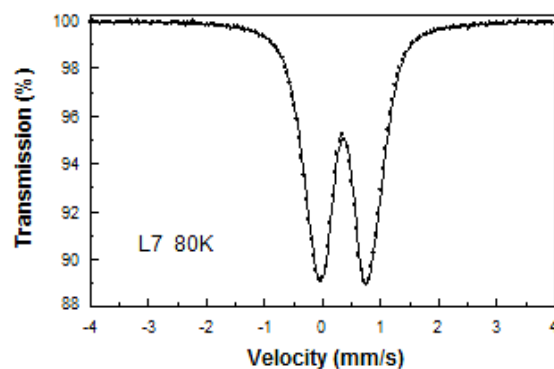
Мьосбауерови спектри, получени от среда SIGP се състоят от единичен  $\text{Fe}^{3+}$  дублетен компонент. Стойностите на  $\Delta E_{q,m}$  са значително по-високи от тези, съобщени в литературата за синтетични слабо кристални видове  $\gamma\text{-FeOOH}$  (De Grave et al., 1986, 1996, 2005) и наподобяват тези на някои ферихидритни видове.



**Фигура 25.** Мьосбауерови спектри на природен биогенен материал.



**Фигура 26.** Мьосбауерови спектри на проба от среда на Адлер.



**Фигура 27.** Мьосбауерови спектри на проба от среда SIGP.

Мьосбауеровите параметри показаха наличие на желязни йони в различни степени на окисление и координация, включени в различни фази. Чрез изчислените Мьосбауерови параметри са идентифицирани следните фази в изследваните образци:  $\gamma\text{-FeOOH}$  (лепидокроцит),  $\alpha\text{-FeOOH}$  (гьотит) и  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (магнетит).

Всички образци съдържат дублетен компонент, който се дължи на  $Fe^{3+}$ , високоспинови октаедрично координирани Fe йони, включени в желязо-оксидни и/или желязо-хидроксидни частици с размери под 10 nm, проявяващи суперпарамагнетизъм. Това се регистрира с Мьосбауеровата спектроскопия като преход на секстетен спектър в дублетен за вещества с магнитно подреждане, причинено от топлинни флуктуации на магнитния вектор на частицата.

Мьосбауерова спектроскопия на химически синтезирани и биогенни наноразмерни наночастици от магнетит показва, че и двата типа частици имат 100% суперпарамагнитна фаза при стайна температура. С помощта на нискоенергийна M $\ddot{o}$ S се доказва (Nedkov et al., 2013), че наноразмерните магнетитни наночастици имат дефектен повърхностен слой с дебелина от порядъка на 3 nm, в който дефектите са под формата на „ваканции“ (отсъствие на катион) в октаедричната кристална подрешетка на ферошпинела.

#### **9.6. Неутронно-активационен анализ за определяне на елементния състав на оксидите**

Филтруваните и изсушени при стайна температура биопродукти са анализирани с помощта на стандартизиран неутронно-активационен анализ (NAA) за количествено изследване на елементния състав. Стабилността на създадените биотехнологии за получаване на желязни оксиди/(окси)хидроксиди се доказва, изследвайки проби от естественото местообитание (планина Витоша – референтна проба) на посочените бактерии и на такива, получени при култивирането им в лабораторни условия на хранителни среди Адлер, ИССЛ и SIGP.

Общо 30 елемента и техните радионуклиди са определени в Центъра за енергийни изследвания към Изследователския реактор на Унгарската академия на науките, но повечето от тези елементи имат приблизително същите малки количества, както в хранителната среда или с много слаба промяна в измерените проби. Табл. 10 обобщава резултатите от NAA за съдържание на желязо в изследваните проби и добре илюстрира възможностите на биотехнологичния подход за получаване на значителни количества от целевите желязни биопродукти в лабораторни условия.

**Таблица 10.** Съдържание на желязо в различни проби, получено от неутронно-активационния анализ.

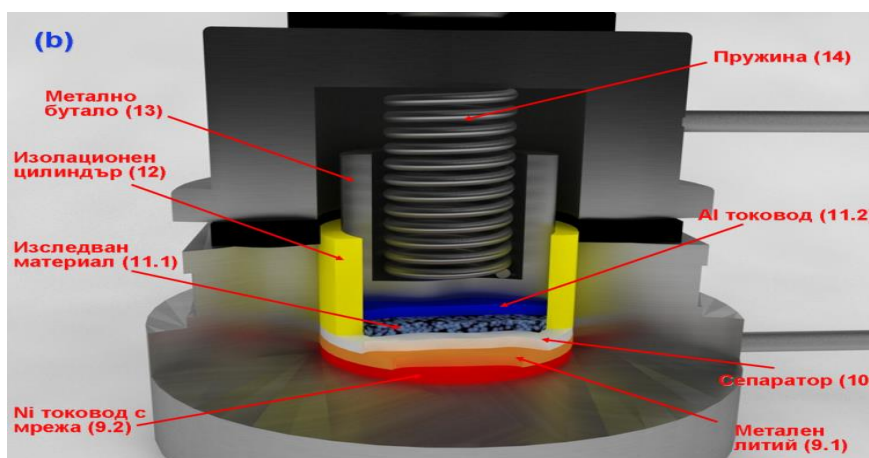
| Елемент | Единици | Референтна проба - Витоша | Проба от среда на Адлер – динамично култ. | Проба от среда ИССЛ – статично култ. | Проба от среда SIGP – динамично култ. |
|---------|---------|---------------------------|---|--------------------------------------|---------------------------------------|
| Fe      | g/kg    | 93±4                      | 375±17                                    | 486±22                               | 453±40                                |

Неутронно - активационният анализ показва, че при култивирането на бактериите при определени условия се получават по-голямо количество желязни съединения (повече от 3.8 пъти) в сравнение с естествената среда на развитие на бактериите. Високо ниво на обогатяване с желязо е установено във всички проби, получени в лабораторни условия. Силното нарастване на съдържанието на Fe зависи от хранителната среда и е най-високо в среда ИССЛ.

## 10. Изследване на потенциалните възможности на оксидите за приложение в електрониката, катализата и екологията

### 10.1. Биогенен гъотит като прекурсор за електрохимичен синтез на $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ с приложение в суперкондензаторни батерии (ИЕЕС – БАН)

За провеждане на електрохимичните изследвания са разработени електрохимични разглобяеми лабораторни клетки, с метален корпус, симулиращи реални конструкции на суперкондензатори тип “копче” (Фиг. 28). Електродният пакет на клетката се състои от два дискови (моделни) електрода ( $\phi = 15$  мм) и диелектричен сепаратор. Монтажът на клетката е извършен в сух бокс (20 ppm влага). Избран е и подходящ сепаратор от нетъкан текстил. Електродният пакет се напоява с безводен електролит и разтворител от пропилен карбонат. Разтворителят се суши с помощта на молекулно сито в продължение на една седмица, а солите се изсушават под вакуум при  $60^\circ\text{C}$  в продължение от 6 –12 h.



Фигура 28. Лабораторна клетка за електрохимични изпитвания тип „Копче”.

Цикличните зарядно - разрядни характеристики са снети с помощта на ARBIN BT 2000 модул за галваностатични циклични изпитвания на лабораторни клетки с компютърен запис на основните електрохимични характеристики (Фиг. 29).



**Фигура 29.** Общ вид на апаратурата за електрохимични изпитвания.

От основните фази, които се формират в резултат на жизнената дейност на бактериите (лепидокроцит ( $\gamma$ -FeOOH), гьотит ( $\alpha$ -FeOOH) и магнетит ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )) са подбрани два типа проби - от среда на Адлер и ИССЛ, които съответно имат най-високо съдържание на лепидокроцит и гьотит с ясно изразена кристална фаза. Поради тази причина тези две проби се оказват най-подходящи за електрохимични изпитвания, в частност за направата на асиметрични суперкондензатори и литиеви батерии.

Биомасата от среда на Адлер, наричана за по-кратко активна маса, се използва за отрицателен електрод в суперкондензатора, като предварително лепидокроцита е накален за 4 часа при  $t = 400^\circ\text{C}$  в аргонова среда. След термичното третиране на лепидокроцита, наличието на наноразмерен магнетит е доказвано с рентгено-структурен анализ (XRD). След термичното третиране на гьотит при същите условия с XRD е установено наличието на наноразмерен хематит.

Проведени са следните електрохимични изпитвания:

1) Симетрични кондензатори с електроди от активен въглен (AC - TDA Research  $1600 \text{ m}^2/\text{g} \ll 44 \text{ nm}$ ) и различни електролити А – електролит  $\text{TEABF}_4$ ; В – електролит  $\text{LiBF}_4$ . Тест режим:  $I = 125 \text{ mA g}^{-1}$ ;  $U_{\text{min}} = 0.6 \text{ V}$ ;  $U_{\text{max}} = 3.4 \text{ V}$ .

2) Електрохимични изпитвания на симетричен суперкондензатор при различни токови натоварвания с електролит  $\text{LiBF}_4$ .

3) Електрохимични изпитвания на магнетит в литиево-йонна клетка.

4) Електрохимични изпитвания на асиметричен суперкондензатор на база композит с био магнетит - активен въглен с електролит  $\text{LiBF}_4$ .

5) Електрохимични изпитвания на био хематит в литиево-йонна клетка с електролит  $\text{LiBF}_4:\text{EC}/\text{DMC}$ : положителен електрод: хематит ( $\alpha$ - $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ), отрицателен електрод: литий, сепаратор: Гласмат (GM 0.7).

6) Електрохимични изпитвания на асиметричен суперкондензатор на база композит био хематит ( $\alpha$ - $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ): активен въглен с електролит  $\text{LiBF}_4$  - положителен електрод:

активен въглен (АС), отрицателен електрод: хематит ( $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ):АС 1:1, Сепаратор: Гласмат.

Резултатите от проведените експерименти показват, че:

⇒ Суперкондензаторите, използващи електролит TEABF<sub>4</sub> отдават капацитет 60 Fg<sup>-1</sup>, а тези с електролит, съдържащ Li<sup>+</sup> отдават 30 Fg<sup>-1</sup> при токово натоварване 120 mA g<sup>-1</sup>.

⇒ Асиметричният кондензатор, използващ био магнетит в композит АС/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> = 1:1 отдава капацитет, надвишаващ с 50% този на симетричния суперкондензатор, използващ електроди от активен въглен и същия електролит. Електродът, използващ композитен материал АС/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> = 1:8 показва двукратно по-голям капацитет от този на симетричния кондензатор.

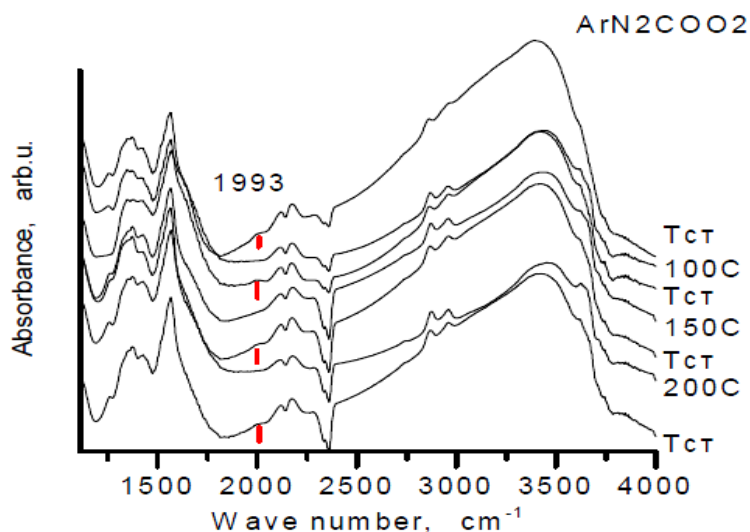
⇒ Асиметричен суперкондензатор с отрицателен композитен електрод от хематит с биогенен произход работи ефективно като анод в литиево-йонна батерия (специфичен капацитет до 800 mAhg<sup>-1</sup> и токови натоварвания 240 mA g<sup>-1</sup>). При използването на хематита в състава на асиметрична суперкондензаторна система с отрицателен електрод композитен АС/Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 1:1 е достигнат фарадеев капацитет 150 Fg<sup>-1</sup> при токови натоварвания 120 mA g<sup>-1</sup>, като суперкондензаторът работи ефективно при токови натоварвания до 500 mA g<sup>-1</sup> (надвишаващ два пъти капацитета на симетричния суперкондензатор).

⇒ Суперкондензаторът на база хематит притежава най-високи параметри.

## **10.2. Тестови изследвания за пригодността на материалите като носители и катализатори. Каталитичен тест (ИК – БАН)**

Изследвана е активността на образеца от природен биогенен материал в реакция на окисление на СО в поток от смес Ar+N<sub>2</sub>+СО+O<sub>2</sub> (90 мл/мин., 8 об.% СО, 11 об.% O<sub>2</sub>) в температурния интервал 50–200°C (Фиг. 30). Изводи за каталитичните свойства на изследвания материал са направени на основата на измененията на интензивността на ивиците за СО и СО<sub>2</sub> при стайна и съответна реакционна температура. При всички изследвани температури (50, 100, 150 и 200°C) отсъства ивицата за адсорбиран СО при 1993 cm<sup>-1</sup>. След обработка при 50°C и охлаждане на образеца в сместа до стайна температура в спектъра присъства ивица при 1258 cm<sup>-1</sup>, която е стабилна и при повишени температури. Тази ивица се отмества към по-високите вълнови числа до 1263 cm<sup>-1</sup> с повишаване на температурата. Ивицата може да бъде отнесена към карбонатна структура.



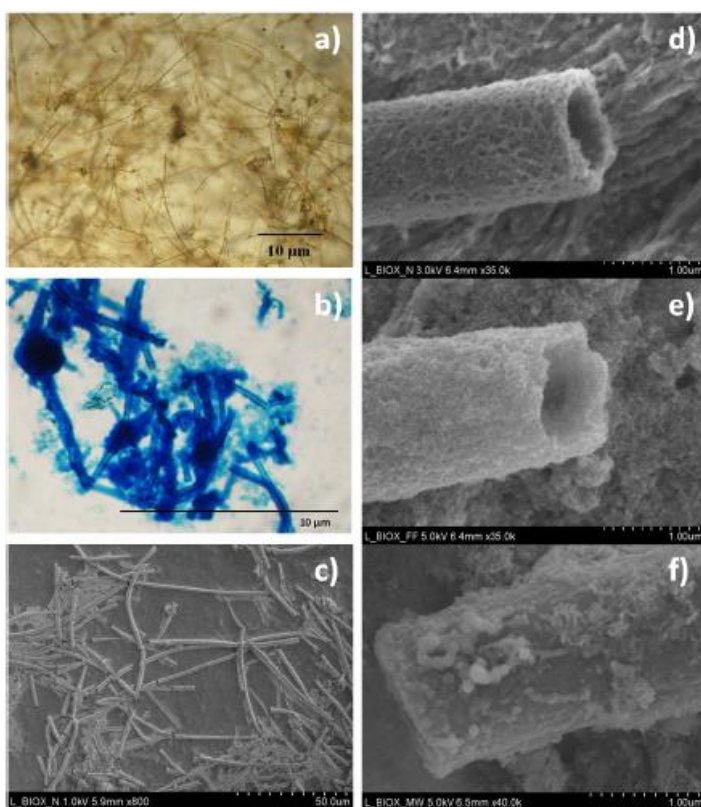


**Фигура 30.** DRIFT спектри на образец от природен биогенен материал в поток от смес  $\text{Ar}+\text{N}_2+\text{CO}+\text{O}_2$  при различни условия.

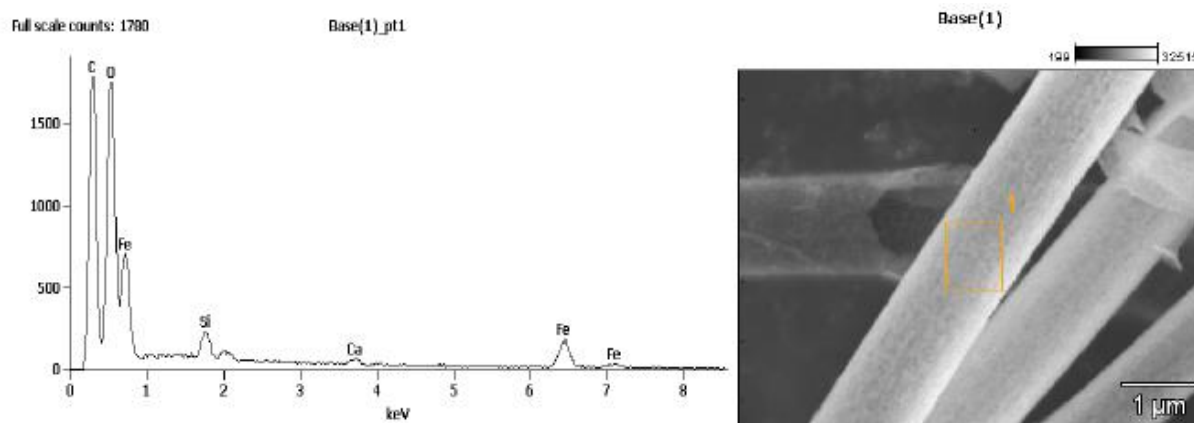
При експериментите е установено, че след охлаждане на образеца в реакционната смес до стайна температура в спектъра се наблюдава ивица при  $1993\text{ cm}^{-1}$ , която по-горе е отнесена за адсорбиран CO. Този резултат може да се обясни със стабилност на активните места за адсорбция на CO на повърхността на образеца. Въпреки показаната от образеца ниска каталитична активност в изследваната реакция, за което може да се съди по относително незначителното изменение на интензивността на ивиците за CO в газовата фаза с увеличение на температурата, се смята, че изследваният материал може да бъде модифициран и използван като носител на катализатори за окисление на CO.

### 10.3. Калъфи от *Leptothrix* sp. с остатъчна намагнитеност като ефективни и биосъвместими материали за биотехнологии и технологии за околната среда (Лаборатория по нанобиотехнологии, Чешка академия на науките (ЧАН))

Природни калъфи от *Leptothrix* sp. са събрани от естествен водоизточник (поток в Ческе Будейовице, Чехия) и ясно визуализирани дълги калъфи (с дължина често над  $50\text{ }\mu\text{m}$ ), използвайки светлинна и сканираща електронна микроскопия (Фиг. 31 а, с). При по-голямо увеличение може да се види типичната им структура (Фиг. 31 d), а типичния диаметър на калъфите е  $1\text{-}1.5\text{ }\mu\text{m}$ . Енергийно-дисперсионна рентгенова спектроскопия (Energy dispersive X-ray spectra - EDS), както и оцветяване с берлинско синило доказаха наличието на желязо в природните калъфи от *Leptothrix* (Фиг. 31 b и Фиг. 32).



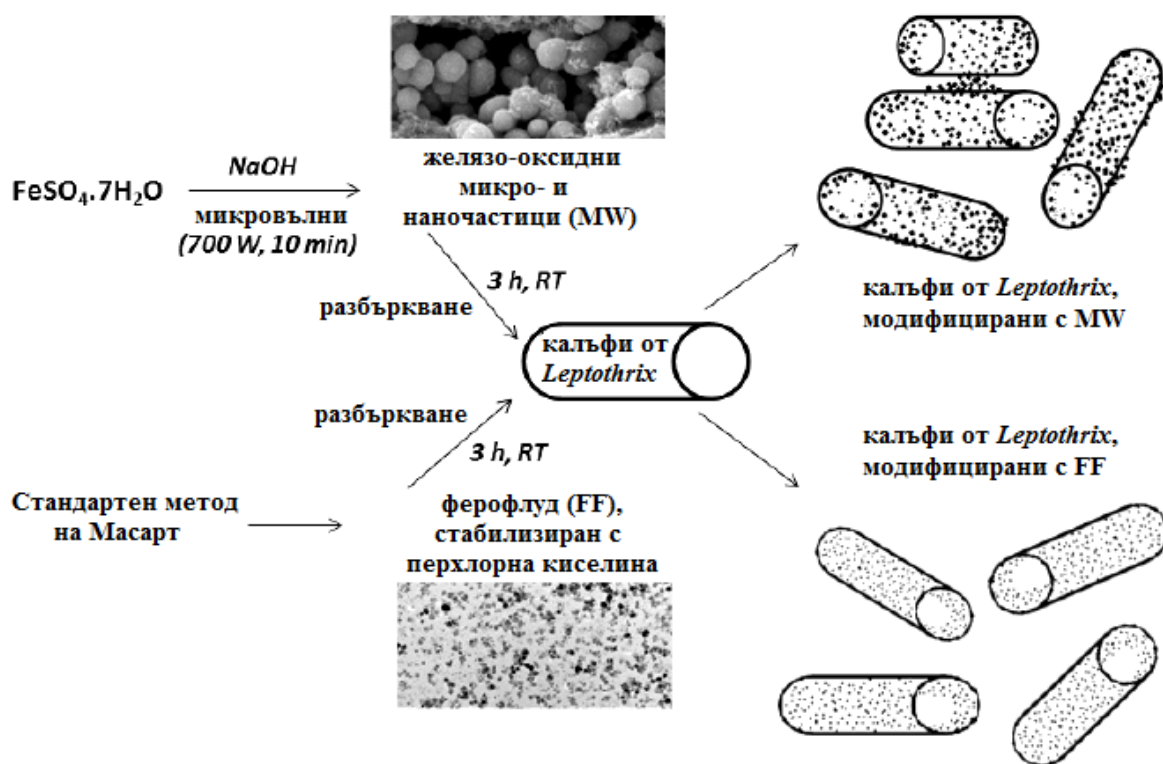
**Фигура 31.** (а) Светлинна микроскопия на природни калъфи от *Leptothrix* sp.; и (b) природни калъфи след оцветяване с берлинско синило; (c и d) сканираща електронна микроскопия на природни калъфи от *Leptothrix* sp.; (e) калъфи, модифицирани с ферофлуид; и (f) калъфи, модифицирани с микровълново-синтезирани магнитни частици.



**Фигура 32.** Енергийно-дисперсионни рентгенови спектри (EDS) на природни калъфи от *Leptothrix* sp.

Свързването на калъфите със синтетични желязо-оксидни нано- и микрочастици е изследвано чрез използването на два вида материали (виж реакционната схема на Фиг. 33). Първият материал е синтезиран от железен сулфат при високо рН под действието на облъчване с микровълни. Използването на една желязна (2+) сол като прекурсор по време на микровълновия синтез прави тази процедура значително по-лесна за изпълнение, в сравнение с аналогични процедури, когато например се използват едновременно две железни соли (2+ и 3+) (Safarik & Safarikova, 2014; Zheng et al., 2010). Микровълновият синтез води до получаване на наночастици от железен оксид с диаметър, вариращ между около 25 и 100 nm. По време на синтеза, наночастиците

образуват стабилни агрегати с микроразмери (максималният размер на агрегатите е около 20  $\mu\text{m}$ ). XRD модел на синтезираните магнитни частици показва характеристики, типични за нано- до микрочастици от магнетит; последващ анализ, използвайки Мьосбауерова спектроскопия потвърди наличието на нестехиометричен магнетит (Maderova et al., 2016). Като втори желязо-оксиден материал е използван ферофлуид на водна основа, стабилизирани с перхлорна киселина (Massart, 1981), състоящ се от магемитни наночастици с диаметри, вариращи между 5 и 20 nm и среден диаметър на частиците около 13 nm (Mosiniewicz-Szablewska et al., 2007; Mosiniewicz-Szablewska et al., 2010).



**Фигура 33.** Реакционна схема, показваща процеса на магнитна модификация на природните (нативните) калъфи от *Leptothrix* sp.

Смесването както на природните, така и на магнитно-модифицираните калъфи от *Leptothrix* с водна суспензия на двата изследвани материала (FF и MW) доведе до отлагането на желязо-оксидни частици и техните агрегати върху повърхността на калъфите, което е потвърдено чрез СЕМ (Фиг. 31 е, f). Магемитните наночастици покриват хомогенно повърхността на калъфите, докато магнетитните частици формират неравномерно разположени кълъстери. Свързването на синтетични желязо-оксидни частици е стабилно в продължение най-малко на два месеца. Не се наблюдава разлика в свързването на частиците както към природните (естествените), така и към

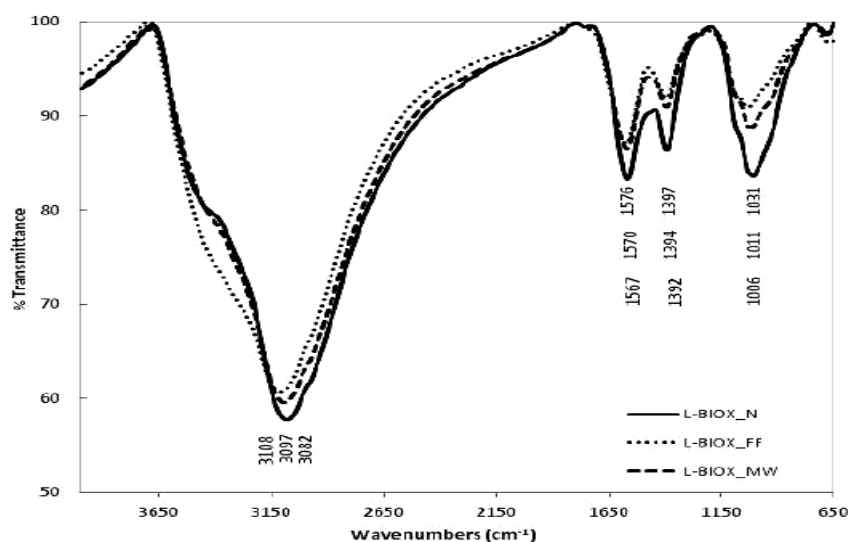
автоклавирани калъфи. EDS спектрите на магнитно-модифицираните калъфи са подобни на спектрите на немодифицираните калъфи (Фиг. 32).

Поради факта, че и двата вида желязо-оксидни частици (магнетитни и магемитни) проявяват феримагнитно поведение (с остатъчна намагнитеност), модифицираните калъфи от *Leptothrix* лесно могат да бъдат разделени с редкоземни постоянни магнити или достъпни в търговската мрежа магнитни сепаратори (Фиг. 33).



**Фигура 33.** Демонстрация на магнитна сепарация на магнитно-модифицирани калъфи: външен изглед на водна суспензия от нативни калъфи от *Leptothrix* (вляво), суспензия от калъфи след магнитна модификация с ферофлуид (в средата) и демонстрация на магнитна сепарация на магнитно-модифицираните калъфи (вдясно).

Функционалните групи както на природната, така и на магнитно-модифицираната биомаса от *Leptothrix* sp. са разкрити с помощта на инфрачервена спектроскопия (FTIR) в обхвата от  $650\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ . И трите проби (природната проба и двата вида магнитно-модифицирани проби) показват подобни спектри с някои малки разлики в позициите на бандовете, които може да са резултат от отложените желязо-оксидни частици върху калъфите (Фиг. 34). Широката и силна адсорбционна вибрация около  $3100\text{ cm}^{-1}$  може да се дължи на -ОН разтягащи трептения на полизахаридните вериги. Депротонираната карбоксилна група показва два силни банди до  $1400$  и  $1570\text{ cm}^{-1}$  съответно за симетрично и асиметрично разтягащо трептене. Магнитните желязни оксиди имат различен спектър в т.нар Fe-O обхват (около  $350\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ ). Бандовете около  $1010\text{ cm}^{-1}$  може да се дължат на присъствието на  $\gamma\text{-FeOOH}$  в пробата (Shopska et al., 2013; Khanlou et al., 2015).



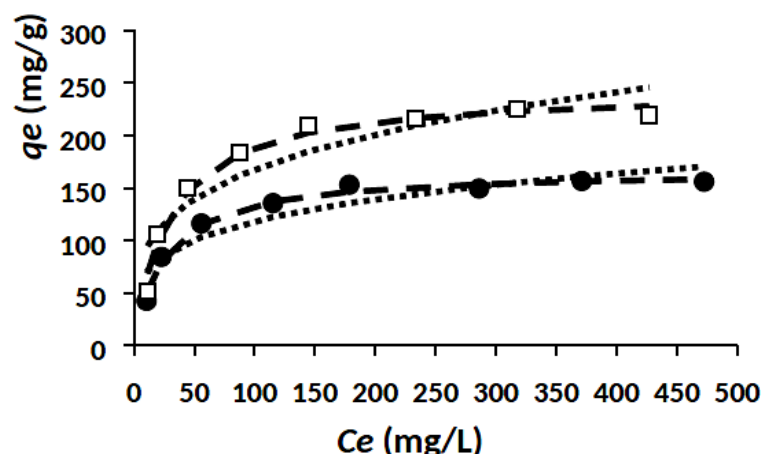
**Фигура 34.** FTIR спектъри на нативни и магнитно-модифицирани калъфи от *Leptothrix* (....., с ферофлуид; - - - - - , с микровълново-синтезиран магнетит).

Резултатите от проведените експерименти показват, че калъфите от *Leptothrix* спонтанно свързват синтетични желязо-оксидни нано- и микрочастици, като по този начин се формира магнитен материал, отговарят на външно магнитно поле, който може да се използва в екологични технологии и потенциални биотехнологични приложения.

#### **10.4. Калъфи от *Leptothrix* sp. като адсорбент за отстраняване на синтетични багрила от водни разтвори (Лаборатория по нанобиотехнологии, ЧАН)**

Адсорбционните свойства на магнитно-модифицираните природни калъфи от *Leptothrix* sp. са тествани с водоразтворимите багрила кристално виолетово и амидо черно 10Б, съответно с основна (алкална) и с кисела природа.

**Адсорбцията на кристално виолетовото багрило** е оценена за двата типа магнитно-модифициран биосорбент при стайна температура и рН 10, при което е постигната максимална адсорбция. При предварителни експерименти се установи, че процесът на адсорбция е много бърз. Равновесието на адсорбционния процес се достига в рамките на 15 – 30 минути. Равновесните адсорбционни изотерми (2,5 часа инкубационно време) за двата адсорбента са показани на Фиг. 35. Анализът на експерименталните данни е извършен, използвайки изотермните уравнения на Лангмюр и Фройндлих. Адсорбцията на кристално виолетово може да бъде описана по-добре чрез модела на Лангмюр; стойностите на изчислените коефициенти са показани в Табл. 11. Стойностите на максималния адсорбционен капацитет за кристално виолетово при рН 10 са 243.1 mg багрило на 1 грам изсушен адсорбент, модифициран с магнетитни частици, синтезирани микровълново, и 166.6 mg багрило на 1 грам изсушен адсорбент, модифициран с ферофлуид.



**Фигура 35.** Равновесни адсорбционни изотерми на Лангмюр (- - -) и Фройндлих (.....) за кристално виолетово върху кальфи от *Leptothrix*, модифицирани с микровълново-синтезиран магнетит (□) и ферофлуид (●).

**Таблица 11.** Параметри на Лангмюр и Фройндлих за адсорбцията на кристално виолетово, получен чрез нелинеен регресионен анализ.

| Изотермен модел | Параметри                             | FF    | MW    |
|-----------------|---------------------------------------|-------|-------|
| Лангмюр         | $q_m$ (mg/g)                          | 166.6 | 243.1 |
|                 | $\alpha_L$ (L/mg)                     | 0.040 | 0.035 |
|                 | SEE                                   | 4.80  | 8.73  |
| Фройндлих       | $K_F$ [(mg/g) (L/mg) <sup>1/n</sup> ] | 40.33 | 50.05 |
|                 | $N$                                   | 4.27  | 3.81  |
|                 | SEE                                   | 16.40 | 25.29 |

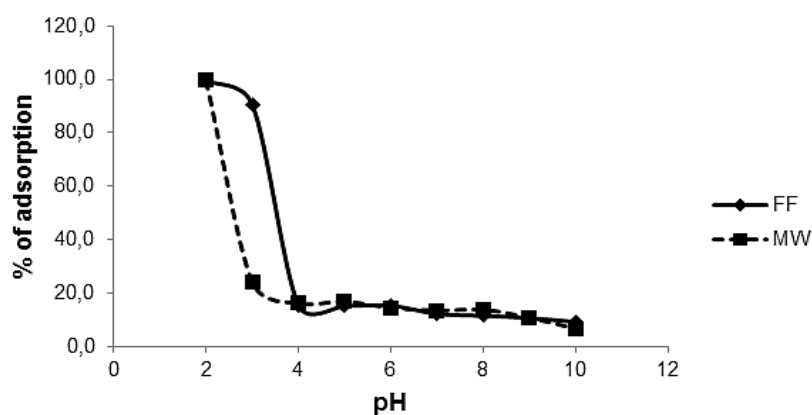
Експерименталните кинетични данни са изчислени за кинетичните модели от псевдо-първи (P-1-O) и псевдо-втори ред (P-2-O) въз основа на получените корелационни коефициенти е изчислена стойността  $q_{eq}$ . Както е обобщено в Табл. 12, корелационните коефициенти за двата изследвани материала, получени от модела от P-2-O са много по-високи ( $> 0.999$ ), отколкото тези, получени от кинетичния модел от P-1-O (0.630-0.646). Едновременно с това,  $q_{eq}$  стойностите, изчислени от кинетичния модел от P-2-O ( $q_{eq\ calc}$ ) се приближават повече до експерименталните  $q_{eq}$  стойности ( $q_{eq\ exp}$ ). Въз основа на тези резултати, може да се обобщи, че процесът на адсорбция следва кинетичния модел от псевдо-втори ред (P-2-O).

**Таблица 12.** Стойностите на скоростните константи, капацитети и коефициентите на регресия на кинетичните модели от псевдо-първи и псевдо-втори ред за кристално виолетово.

| Адсорбент | $C_{tot}$<br>(mg/L) | $q_{eq \text{ exp}}$<br>(mg/g) | Модел от псевдо-първи ред |               |        | Модел от псевдо-втори ред |                  |        |
|-----------|---------------------|--------------------------------|---------------------------|---------------|--------|---------------------------|------------------|--------|
|           |                     |                                | $q_{eq}$ (mg/g)           | $k_1$ (1/min) | $R^2$  | $q_{eq}$ (mg/g)           | $k_2$ (g/mg min) | $R^2$  |
| FF        | 100                 | 49.0                           | 6.0                       | 0.0315        | 0.6461 | 48.1                      | 0.0307           | 0.9998 |
| MW        | 100                 | 58.5                           | 2.5                       | 0.0323        | 0.6302 | 57.8                      | 0.3325           | 0.9999 |

**Адсорбцията на багрилото амидо черно 10Б** е оценена за двата типа магнитно-модифициран биосорбент при стайна температура и рН 2. Нативните и двата вида магнитно-модифицирани калъфи са характеризирани посредством СЕМ. В детайли са изследвани различни параметри, такива като рН, контактно време, температура и първоначална концентрация, които съществено повлияват процеса на адсорбция, използвайки адсорбентите, намагнитени по двата метода. Експерименталните данни са приложени към различни равновесни и кинетични модели.

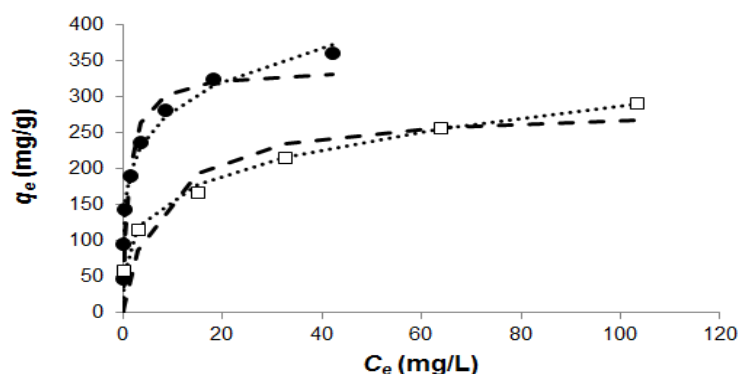
рН е важен параметър, който влияе значително върху процесите на адсорбция (Ojha & Vulasara, 2015). За да се изследва ефекта на първоначалното рН върху адсорбцията на амидо черно 10Б на намагнитените калъфи от *Leptothrix* (magnetic *Leptothrix* sheaths (MLS)) са извършени пардидни адсорбционни експерименти при рН стойности между 2 и 10, използвайки разтвор на багрилото с концентрация 100 мг/л при скорост на разбъркване 27 об./мин. и температура от 24°C (297.15 К) за 150 минути. Фиг. 36 показва профила на ефективността на адсорбция на багрилото (%) на MLS срещу диапазона на рН. Процентът на адсорбция на багрилото значително намалява с увеличаване на първоначалното рН на разтвора, вероятно поради анионния характер на избраното багрило (Garg et al., 2015). Следователно всички по-нататъшни експерименти са проведени при ниско първоначално рН (рН 2).



**Фигура 36.** Зависимост на ефективността на адсорбцията на багрилото (амидо черно 10Б) върху рН на разтвора, използвайки намагнитените по двата описани метода калъфи от *Leptothrix* (MW-MLS и FF-MLS).



Адсорбционната способност на двата вида магнитно-модифицирани калъфи на *Leptothrix* за водоразтворимото органично багрило амидо черно 10Б е тествана при 279.15 К, 297.15 К и 313.15 К. Адсорбцията на багрилото върху двата тествани магнитни биосорбента е анализирана чрез двата най-често използвани адсорбционни изотермни модела, а именно тези на Лангмюр (Langmuir) и Фройндлих (Freundlich). Експерименталните данни за всеки изотермен модел са приложени въз основа на оценка на стандартната грешка (standard error of estimate (SEE)). 95% от съдържанието на багрилото (концентрация 100 мг/л) се адсорбира в рамките на 5 минути и при двата вида магнитен биосорбент. Въпреки, че равновесието на адсорбцията се достига в рамките на 15 минути, времето за инкубация е 150 минути. Равновесните адсорбционни изотермни модели за двата изследвани материала са показани на Фиг. 37. Адсорбцията на амидо черно 10Б се описва по-добре от модела на Фройндлих - стойностите на изчислените коефициенти са показани в Табл. 13. Отличният адсорбционен капацитет на адсорбентите е демонстриран на Фиг. 38. Максималният адсорбционен капацитет на двата вида магнитни материали (MW и FF) за амидо черно 10Б при стайна температура е съответно 286.1 и 339.2 mg багрило на 1 грам адсорбент при рН 2.

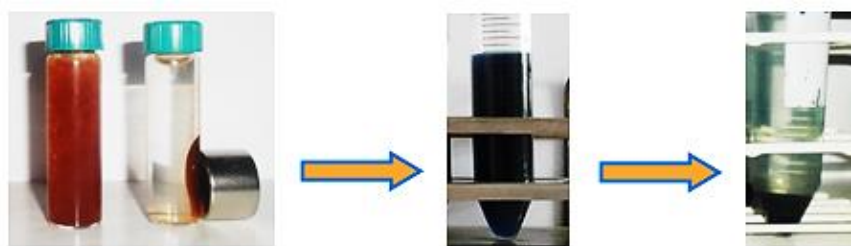


**Фигура 37.** Равновесни адсорбционни изтерми на Лангмюр (- - -) и Фройндлих (.....) на амидо черно 10Б за калъфите от *Leptothrix*, магнитно-модифицирани с микровълново синтезиран магнетит (□) и ферофлуид (●).

**Таблица 13.** Параметри на Лангмюр и Фройндлих за амидо черно 10Б, получени чрез нелинеен регресионен анализ.

| Изотермен модел | Параметри                             | 279.15 К |       | 297.15 К |       | 313.15 К |       |
|-----------------|---------------------------------------|----------|-------|----------|-------|----------|-------|
|                 |                                       | FF       | MW    | FF       | MW    | FF       | MW    |
| Лангмюр         | $q_m$ (mg/g)                          | 320.8    | 299.2 | 339.2    | 286.1 | 368.4    | 382.1 |
|                 | $\alpha_L$ (L/mg)                     | 0.59     | 0.83  | 0.94     | 0.14  | 0.95     | 0.97  |
|                 | SEE                                   | 28.61    | 44.50 | 50.27    | 37.28 | 75.59    | 41.73 |
| Фройндлих       | $K_F$ [(mg/g) (L/mg) <sup>1/n</sup> ] | 131.8    | 135.5 | 178.1    | 88.9  | 204.4    | 190.0 |
|                 | $n$                                   | 3.44     | 3.03  | 5.06     | 3.94  | 5.04     | 2.86  |
|                 | SEE                                   | 23.84    | 35.31 | 44.35    | 7.79  | 53.42    | 34.88 |





Магнитен адсорбент (МА)

МА с добавено багрило

след адсорбция

**Фигура 38.** Демонстрация на адсорбционната способност на намагнитените калъфи от *Leptothrix*.

Прилагането на експерименталните данни към кинетичните модели от псевдо-първи и псевдо-втори ред е оценено въз основа на получените корелационни коефициенти и изчислени  $q_e$  стойностите. Кинетичните параметри са обобщени в Табл. 14. Процесът на адсорбция последва кинетичния модел от псевдо-втори ред.

**Таблица 14.** Стойности на скоростните константи, капацитети и регресионни коефициенти на кинетичните модели от псевдо-първи и псевдо-втори ред за амидо черно 10Б.

| Адсорбент | $C_{tot}(\text{mg/L})$ | $q_e(\text{mg/g})$ | Модел от псевдо-първи ред |                     |        | Модел от псевдо-втори ред |                       |        |
|-----------|------------------------|--------------------|---------------------------|---------------------|--------|---------------------------|-----------------------|--------|
|           |                        |                    | $q_e(\text{mg/g})$        | $k_1(1/\text{min})$ | $R^2$  | $q_e(\text{mg/g})$        | $k_2(\text{g/mgmin})$ | $R^2$  |
| FF        | 100                    | 48                 | 1.4                       | 0.0125              | 0.9431 | 47.4                      | 0.0742                | 0.9999 |
|           | 500                    | 232                | 73.1                      | 0.0040              | 0.8523 | 232.6                     | 0.0023                | 0.9998 |
| MW        | 100                    | 58                 | 2.2                       | 0.0170              | 0.8735 | 57.8                      | 0.0491                | 0.9999 |
|           | 500                    | 276                | 48.8                      | 0.0156              | 0.9337 | 277.8                     | 0.0014                | 0.9997 |

Термодинамичните параметри са изчислени, както е описано наскоро от Maderova и сътр. (2016). От Табл. 15 може да се види, че адсорбцията на амидо черно 10Б върху двата адсорбента (FF-MLS и MW-MLS) е спонтанна (отрицателна стойност на енергията на Гибс) и процеса е ендотермичен (положителна стойност на енталпията). Положителната стойност на ентропията показва увеличение в степента на свобода на адсорбираните видове.

**Таблица 15.** Термодинамични параметри за двата вида намагнитени калъфи от *Leptothrix*.

| Адсорбент | $\Delta H^\circ(\text{kJ/mol})$ | $\Delta S^\circ(\text{kJ/mol/K})$ | $\Delta G^\circ(\text{kJ/mol})$ |          |          |
|-----------|---------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|----------|----------|
|           |                                 |                                   | 279.15 K                        | 297.15 K | 313.15 K |
| FF        | 27.161                          | 0.193                             | -27.285                         | -28.618  | -34.100  |
| MW        | 8.230                           | 0.128                             | -28.786                         | -26.555  | -33.685  |

Прилагането на биосорбцията за отстраняване на токсични замърсители от отпадни води е една от най-прогресивните технологии за околната среда. Адсорбцията е много прост метод в сравнение с други процедури и често се използва при третиране на отпадъчни води, съдържащи оцветени примеси и йони на тежки метали (Monash &

Pugazhenthii, 2009). Отстраняването на багрила чрез адсорбция често се основава на използването на природни адсорбенти, при което процесът става икономически осъществим. Освен това природните биосорбенти са възобновяеми, на разположение са в големи количества и са по-евтини в сравнение с други материали, които се използват като адсорбенти, като например активен въглен (Ghaedi et al., 2013a), зеолит (Garg et al., 2015), въглеродни нанотръбички (Sheibani et al., 2015), благородни метали като олово и Ag, натоварени върху активен въглен (Ghaedi et al., 2013b) или наночастици от ZnO върху активен въглен (Ghaedi et al., 2014b).

Въпреки това не са докладвани изследвания за премахването на багрила, използвайки калъфи от *Leptothrix* като адсорбент. Избраното синтетично багрило вреди не само на човешката дихателна система, но също така причинява кожни и очни раздразнения.

Получените резултати показват, че магнитните производни на *Leptothrix* sp. са ефективни и биосъвместими материали, които могат да бъдат управлявани с външно магнитно поле. Това може значително да подобри и опрости биотехнологични процеси и технологии за околната среда.

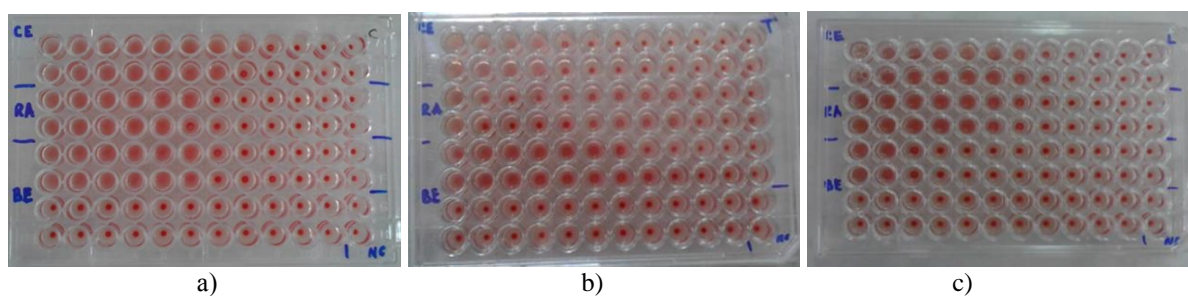
#### **10.5. Калъфи от *Leptothrix* sp. с магнитни свойства като евтини и безвредни за околната среда адсорбенти за имобилизиране на лектини, подходящи за магнитна сепарация**

До момента няма налична информация относно прилагането на процедура за магнитно разделяне за изолирането на лектини, използвайки калъфи от *Leptothrix* sp. Използвани са калъфите от *Leptothrix* sp., намагнитни по двата описани метода и тествани за бързото отделяне на лектин от суров екстракт.

Магнитно-модифицирани природни калъфи от *Leptothrix* sp. (MW-MLS) са тествани за отделяне на лектини от леща (*Lens culinaris*), плод от домати (*Lycopersicon esculentum*) и картофени клубени (*Solanum tuberosum*). Хемаглутинационен тест (НА) показва, че активността на лектините след елюиране с глицин/HCl буфер, pH 2.2 е много слаба за лектин от леща (40 НАУ), добра за лектин от домати (160 НАУ) и отлична за лектин от картоф (640 НАУ) (Фиг. 39). Титърът на НА е оценен след 1 час инкубация при 20°C и се изразява като реципрочен на разреждането на последната проба с видима аглутинация. Количеството на лектина в последната тестова ямка с положителна хемаглутинация се определя като 1 НА единица (1 НАУ).

Възстановени са 50% от лектина от картофени клубени и 100% от лектина от плод на домати (Табл. 16 и 17), докато от лектина от леща са възстановени само 6 %, поради което този лектин не е използван в по-нататъшните експерименти. Тези лектини могат

да се намерят в отпадъчните води в резултат от производствената дейност на хранителната индустрия. Резултатите показват, че магнитните калъфи от *Leptothrix* sp. са подходящи за изолиране на лектини.



**Фигура 39.** Резултати от хемаглутинационния анализ за свързаната елюирана фракция, причиняваща хемаглутинация на а) лектин от *Solanum tuberosum*; б) лектин от *Lycopersicon esculentum*; в) лектин от *Lens culinaris*.

**Таблица 16.** Пречистване на лектини от картофени клубени, използвайки магнитни калъфи от *Leptothrix* sp. като адсорбент.

| Проба  | Обем (ml) | Активност на лектина (HAU ml <sup>-1</sup> ) | Обща активност на лектина (HAU) | Концентрация на белтъка (mg ml <sup>-1</sup> ) | Обща конц-я на белтъка (mg) | Специфична активност на лектина (HAU mg <sup>-1</sup> ) | Фактор на пречистване | Добив (%) |
|--|-----------|--|---------------------------------|--|-----------------------------|---|-----------------------|-----------|
| Суров екстракт от картофени клубени ( <i>Solanum tuberosum</i> ) | 5         | 256  | 1280                            | 2.76   | 13.8                        | 92.8  | 1                     | 100       |
| Елюат (след неутрализация)                                       | 5         | 128  | 640                             | 1.18   | 5.9                         | 108.5   | 1.17                  | 50        |

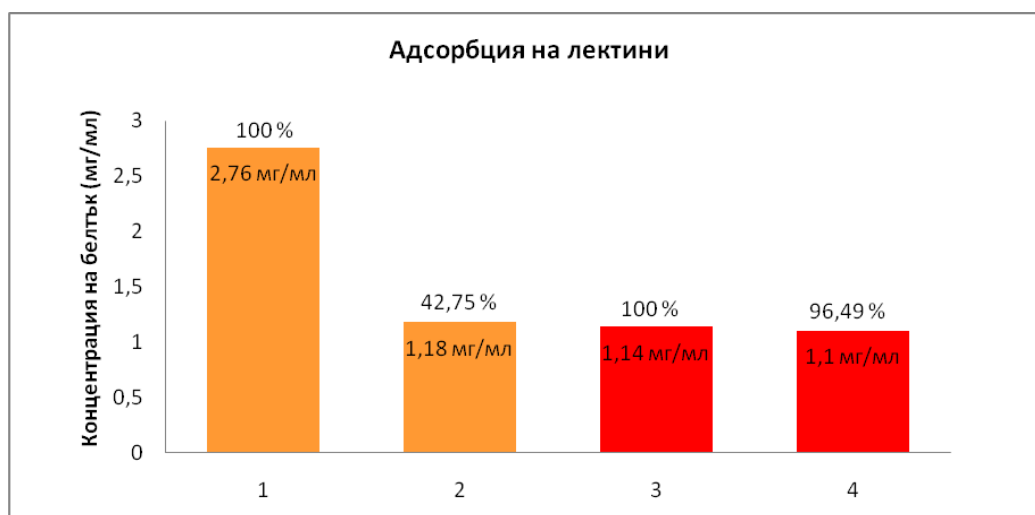
**Таблица 17.** Пречистване на лектини от плод на домати, използвайки магнитни калъфи от *Leptothrix* sp. като адсорбент.

| Проба  | Обем (ml) | Активност на лектина (HAU ml <sup>-1</sup> ) | Обща активност на лектина (HAU) | Концентрация на белтъка (mg ml <sup>-1</sup> ) | Обща конц-я на белтъка (mg) | Специфична активност на лектина (HAU mg <sup>-1</sup> ) | Фактор на пречистване | Добив (%) |
|--|-----------|--|---------------------------------|--|-----------------------------|---|-----------------------|-----------|
| Суров екстракт от плод на домати ( <i>Solanum lycopersicum</i> ) | 5         | 32   | 160                             | 1.14   | 5.7                         | 28.1  | 1                     | 100       |
| Елюат (след неутрализация)                                       | 5         | 32   | 160                             | 1.1  | 5.5                         | 29.1  | 1.04                  | 100       |

Концентрациите на белтъка са определени по метода на Брадфорд (1976), използвайки говежди серумен албумин (BSA) като стандарт (Табл. 18), построявайки стандартна крива за определяне на белтъчната концентрация на изследваните проби. Сравнение на белтъчната концентрация преди и след адсорбция е показано на Фиг. 40.

**Таблица 18.** Получените данни от абсорбцията.

| Белтък в суров екстракт (СЕ) от картоф (мг/мл) | Net A 595 СЕ от картоф | Белтък след елюиране (АЕ) от картоф (мг/мл) | Net A 595 АЕ от картоф | Белтък в суров екстракт (СЕ) от домати (мг/мл) | Net A 595 СЕ от домати | Белтък след елюиране (АЕ) от домати (мг/мл) | Net A 595 АЕ от домати | Фактор на разреждане |
|--|------------------------|---|------------------------|--|------------------------|---|------------------------|----------------------|
| 0  | 0                      | 0   | 0                      | 0  | 0                      | 0   | 0                      | 1                    |
| 0,25   | 0,821                  | 0,25  | 0,832                  | 0,25   | 0,838                  | 0,25  | 0,848                  | 1                    |
| 0,5  | 1,049                  | 0,5   | 1,062                  | 0,5  | 1,033                  | 0,5   | 1,068                  | 1                    |
| 1  | 1,43                   | 1   | 1,433                  | 1  | 1,393                  | 1   | 1,448                  | 1                    |
| 1,4  | 1,76                   | 1,4   | 1,758                  | 1,4  | 1,721                  | 1,4   | 1,739                  | 1                    |
| 1,38   | 1,734                  | 0,59  | 0,742                  | 0,57   | 0,697                  | 0,55  | 0,688                  | 2                    |
| Обща конц-я                                    |                        | Обща конц-я                                 |                        | Обща конц-я                                    |                        | Обща конц-я                                 |                        |                      |
| 1,38 x 2 = 2,76 мг/мл                          |                        | 0,59 x 2 = 1,18 мг/мл                       |                        | 0,57 x 2 = 1,14 мг/мл                          |                        | 0,55 x 2 = 1,1 мг/мл                        |                        |                      |



**Фигура 40.** Сравнение на белтъчната концентрация на изследваните проби преди и след адсорбция, използвайки калъфи от *Leptothrix* sp. като биосорбент:

1 - преди адсорбция – картоф; 2 – адсорбиран лектин от картоф; 3 - преди адсорбция – домати; 4 - адсорбиран лектин от домати.

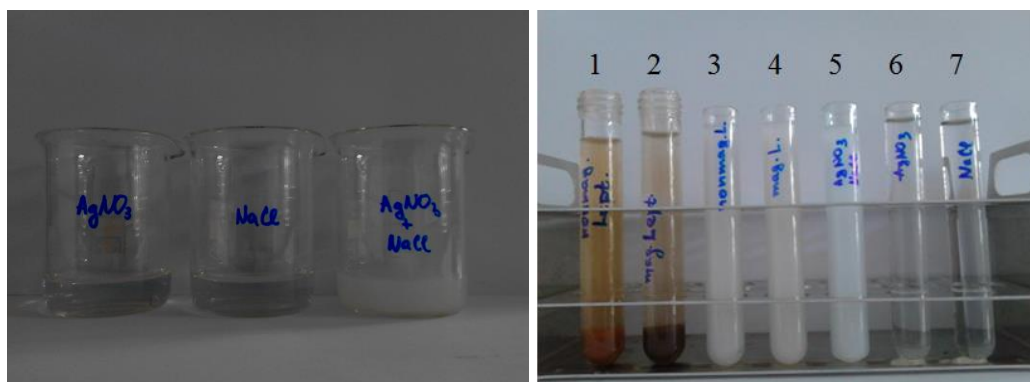
Измервайки концентрацията на белтъчното съдържание преди и след адсорбция, използвайки говежди серумен албумин като стандарт е установено количеството на белтъка и показана адсорбционната способност на *Leptothrix* sp. От направения анализ се вижда, че адсорбционния капацитет на адсорбента е около 1 мг/мл за двата вида растителни лектини.

#### **10.6. Калъфи от *Leptothrix* sp. като биосорбент на Ag йони от разтвор на AgNO<sub>3</sub>** *Leptothrix* sp. е в състояние да натрупва Fe и Mn йони в калъфните си структури.

Тази способност се използва за отстраняване на желязо и манган от подземни води за почистване на водата за питейно-битови цели. Тази технология се използва в много пречиствателни станции по целия свят. В настоящия дисертационен труд също е показана способността на бактериите от този род да натрупват Fe и Mn йони.

Имайки предвид добрата способност на бактериите като биосорбент, са проведени експерименти за установяване на адсорбционната способност на бактериите от род *Leptothrix* за разтворимите йони на Ag.

В този експеримент са използвани природни калъфни структури от *Leptothrix* sp. за адсорбция на сребърни йони от воден разтвор на 10 mM AgNO<sub>3</sub>. Изключително лесен предварителен експеримент за положителен резултат на експеримента е проведен, добавяйки разтвор на 1M NaCl към адсорбента след сорбционния процес. Позитивна реакция за наличието на AgNO<sub>3</sub> в пробата се детектира, когато разтвора от прозрачен става бял, което е индикация за наличие на сребро в изследваната проба (Фиг. 41).



а)

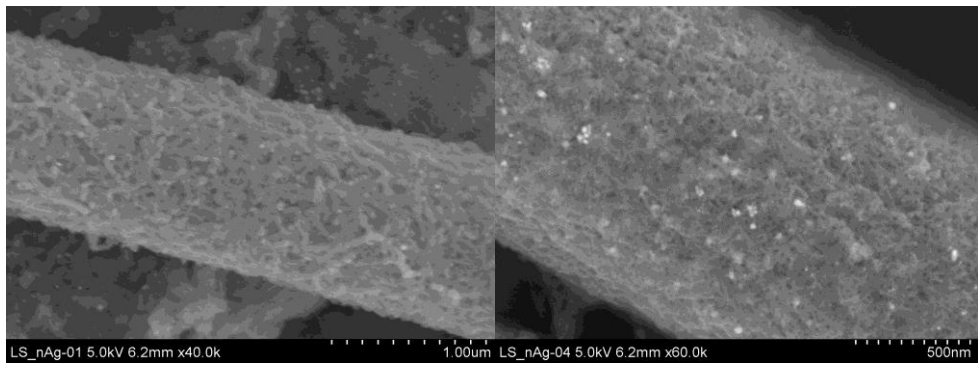
б)

**Фигура 41.** Позитивна реакция за наличието на Ag в изследваната проба - разтвора от прозрачен става бял, което е индикация за наличие на сребро в пробата:

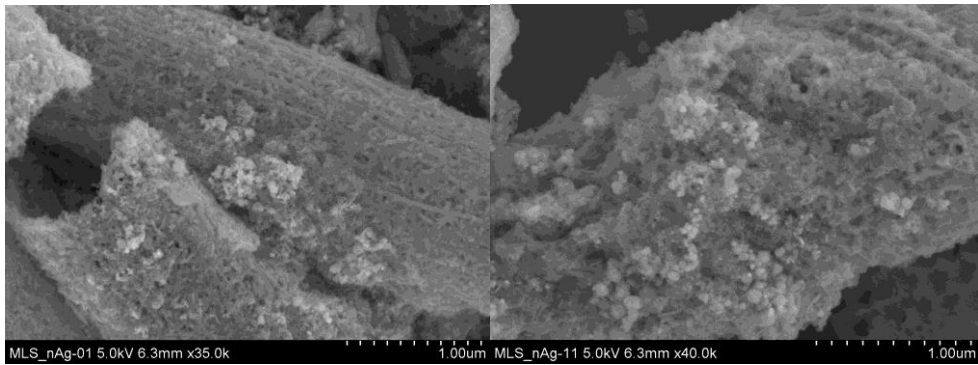
а)  $\text{AgNO}_3 + \text{NaCl} \rightarrow \text{NaNO}_3 + \text{AgCl} \downarrow$ ; б) 1- немагнитни калъфи на *Leptothrix* sp. в разтвор на AgNO<sub>3</sub> след адсорбция; 2 - намагнитени калъфи на *Leptothrix* sp. в разтвор на AgNO<sub>3</sub> след адсорбция; 3 – супернатантата на немагнитни калъфи след адсорбция + разтвор на NaCl; 4 - супернатантата на намагнитени калъфи след адсорбция + разтвор на NaCl; 5 – началната концентрация на AgNO<sub>3</sub> + разтвор на NaCl; 6 - началната концентрация на AgNO<sub>3</sub>; 7 – разтвор на NaCl.

\*По интензивността на оцветяването на разтворите в епруветки 3 и 4, спрямо това в епруетка 5, може да се съди, че част от Ag е адсорбирано.

Адсорбцията на Ag е доказана чрез СЕМ, наблюдавайки сребърните частици като декорация от мъниста върху калъфите (Фиг. 42) - СЕМ показва повърхностната морфология на адсорбента с адсорбираното Ag. SEM-EDS разкри химичния състав на адсорбираните частици и категорично потвърди присъствието на сребро върху калъфните структури (Фиг. 43).

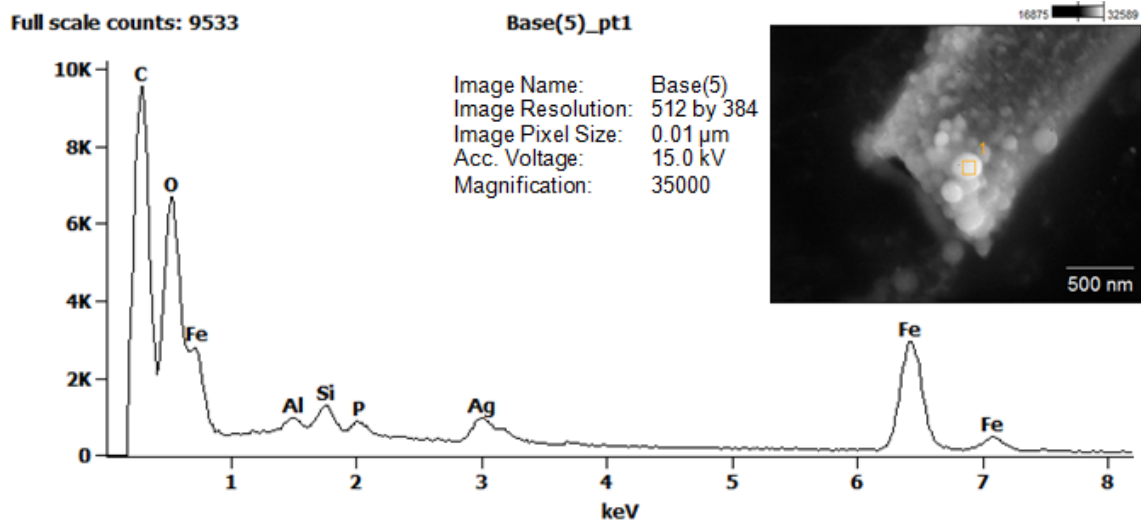


a)



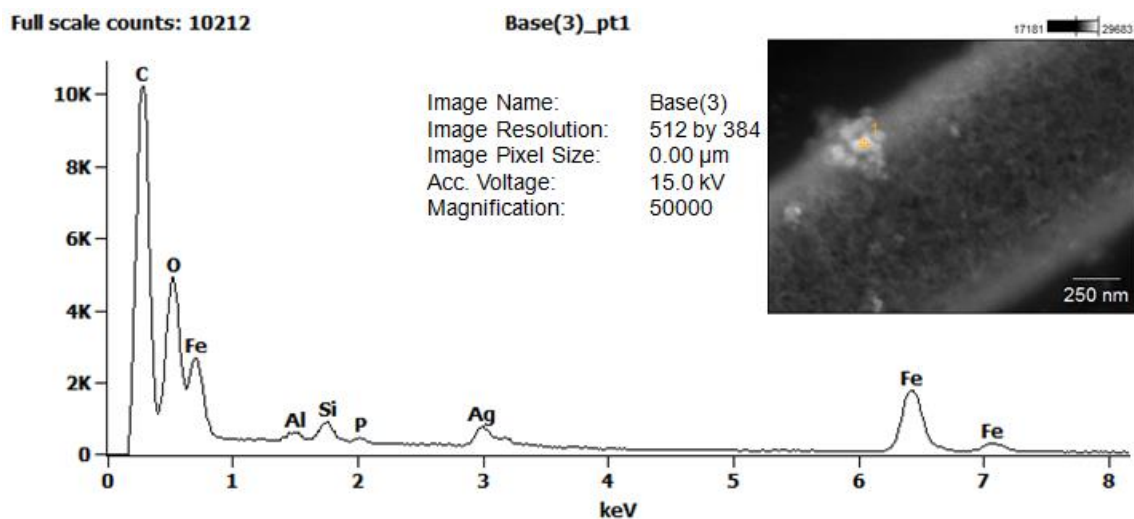
б)

**Фигура 42.** СЕМ, показваща морфологията на кальфните структури от *Leptothrix* sp. с адсорбираното сребро: а) адсорбент – нативни кальфи от *Leptothrix* sp. (NLS); б) адсорбент – магнитни кальфи от *Leptothrix* sp. (MW-MLS).

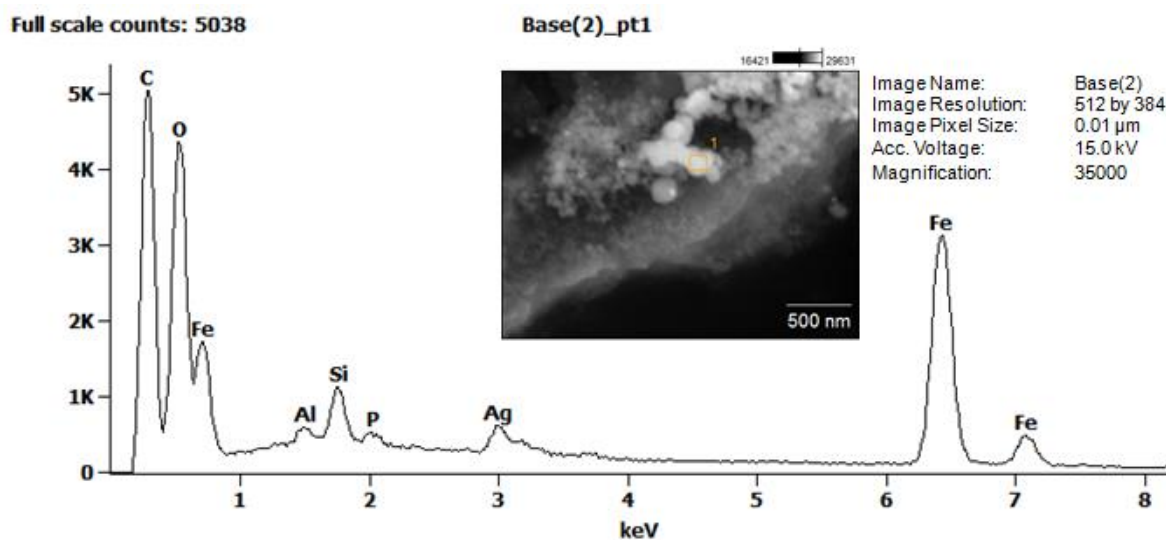


a)





б)



в)

**Фигура 43.** SEM-EDS, показваща химичния състав на адсорбираните частици, потвърждавайки присъствието на сребро върху калъфните структури от *Leptothrix* sp.: а) адсорбент “NLS”; б) и в) адсорбент “MW-MLS”.

В заключение може да се каже, че това е един лесен за изпълнение метод за адсорбция на Ag посредством природен бактериален продукт – калъфни структури от *Leptothrix* sp., които имат афинитета да свързват метални йони. По този начин може да се сведе до минимум потенциалното неконтролно усвояване на сребърни йони от организмите.

## ИЗВОДИ

1. Разработената схема за получаване на обогатени култури и изолиране на чисти култури е подходяща за изолиране на неутрофилни железобактерии от род *Leptothrix*, като най-подходящи за изолация са средите на Адлер, Лиске и ИССЛ при статично култивиране в колби на Ру и Ференбах.
2. Типичните за бактериите калъфни структури се формират единствено на среда SIGP, като образуването им започва на втория ден от култивирането и след 20-дневно култивиране се разпадат.
3. Изолираните 22 чисти култури са идентифицирани като представители на род *Leptothrix*, като 7 изолата са сходни с *L. mobilis*; 6 изолата с *L. cholodnii*; 5 с вида *L. discophora*; 4 проявяват характеристики, които не позволяват да бъдат отнесени към нито един от описаните в определителя видове.
4. Таксономичната принадлежност на изолатите към род *Leptothrix* е потвърдена чрез PCR анализ, посредством избрана нуклеотидна последователност (*mofA* секвенция). Използваният PCR-базиран метод с използване на универсални еубактериални праймери също може да бъде използван при бактериите от този род. Рестрикционният анализ, проведен с рестриктази *Hae III*, *Alu I* не е подходящ за видово диференциране и вътревидова хетерогенност при тези бактерии, докато с рестриктаза *Acc65I* се наблюдава рестрикционен профил, характерен за типовия *Leptothrix discophora* щам SS-1.
5. Най-подходящи за култивиране на бактериите и образуване на железни оксиди/хидрокси са средите на Адлер и Лиске, статично култивиране, стайна температура, продължителност 20 дни.
6. Основната фаза, открита във образуваните железни оксиди/(окси)хидрокси е желязо(III) (окси)хидроксид, главно лепидокроцит и гьотит, и в по-малки количества магнетит, като съставът на оксидите зависи от средата, на която са култивирани бактериите.
7. Магнетитът ( $Fe_3O_4$ ) е основен магнитен материал, като наноразмерността на частиците го прави суперпарамагнитен при стайна температура, докато лепидокроцита ( $\gamma$ - $FeOOH$ ), който е антиферомагнетик има незначителен принос.
8. Повърхностният слой на частицата на биогенния наноразмерен магнетит има структурни изменения, които се различават от тези на такива, получени при конвенционални химични технологии.
9. Получени са данни за приложение на биогенните железни оксиди/хидрокси в експериментални суперкондензаторни системи в дългосрочен циклов режим (до 3000 цикъла), показващи устойчивост на капацитета (загуби под 20%).
10. Магнитно-модифицираните калъфи на *Leptothrix* sp. имат висок адсорбционен капацитет към багрила, лектини (белтъци) и сребърни катиони.
11. Получените хидрокси (лепидокроцит ( $\gamma$ - $FeOOH$ ) и гьотит ( $\alpha$ - $FeOOH$ ) и калъфните структури на *Leptothrix* sp. са потенциални кандидати за създаване на биосензори за откриване на метални замърсявания във водни среди.



12. Полученият суперпарамагнитен магнетит представлява интерес като носител на катализатори за окисление на CO; за приложение при създаване на контрастни течности за ядрено магнитен резонанс и позитронно-емисионна томография за нуждите на диагностицирането в медицината.

## ПРИНОСИ

Като по-съществени приноси от разработването на настоящата работа могат да се посочат:

1. Разработена е схема за изолиране и култивиране на бактериите в лабораторни условия, като са установени оптималните параметри за тяхното развитие и натрупване на биогенни железни оксиди/(окси)хидроксиди.
2. Доказано е влиянието на състава на хранителната среда върху типа на формираните оксиди и са оптимизирани условията за натрупване на биогенни железни оксиди/(окси)хидроксиди от типа лепидокроцит ( $\gamma$ -FeOOH), гьотит ( $\alpha$ -FeOOH) и магнетит ( $Fe_3O_4$ ).
3. Получените резултати по отношение на структурата на суперпарамагнитната частица са убедително потвърждение на емпиричен модел за наноразмерен магнетит, който обяснява измененията на магнитните свойства на такива частици и показва, че в повърхностен слой от 3 nm дефектите нарастват по експоненциален закон от повърхността към вътрешността.
4. За пръв път кальфните структури на *Leptothrix* sp. са използвани като адсорбент за багрила и е доказан високият им адсорбционен капацитет.
5. Разработени са асиметрични суперкондензаторни системи с екстремни параметри, които използват композит от активен въглен и биогенни железни оксиди.

## ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

### Публикации в списания от конференции без импакт фактор

1. Angelova, R., Balabanova, E., Slavov, L., Piev, M., Blagoev, B., Kovacheva, D., Groudeva, V. and Nedkov, I. 2013. Application of electron-micrograph image analysis for nanostructures with biogenic origin. Scientific research of the Union of Scientists in Bulgaria - Plovdiv, series C. Natural Sciences and Humanities, Union of Scientists, International Conference of Young Scientists XVI:134-139. ISSN: 1311-9192
2. Angelova, R., Groudeva, V., Nedkov, I., Sziklai-László, I. and Krezhov, K. 2014. INAA study of synthetic and natural iron bacteria products. In Proceeding of the Second International Conference on Radiation and Dosimetry in Various Fields of Research, Niš, Serbia, 219-222. ISBN: 978-86-6125-101-6

3. Angelova, R., Iliev, M., Mitova, M., Voynova, V., Tasheva, L., Slavov, L., Groudeva, V. and Antonova-Nikolova, S. 2014. Optimization the cultivation of neutrophilic iron bacteria in laboratory conditions. J BioSci Biotech 67-70. ISSN: 1314-6246
4. Veleva, S., Angelova, R., Stoyanov, L., Groudeva, V., Kovacheva, D., Mladenov, M. and Raicheff R. 2014. Biogenic iron oxide-based nanocomposites electrodes for hybrid battery-supercapacitor systems. Nanoscience & Nanotechnology 14:50-52.
5. Angelova, R., Slavov, L., Iliev, M., Mitova, M., Blagoev, B., Nedkov, I. and Groudeva, V. 2015. Biogenic iron oxides from *Leptothrix* sp. for application in the bionanotechnology. Annuaire de l'Université de Sofia "St. Kliment Ohridski" Faculte de Biologie 100(4):231-238.
6. Krezhov, K., Angelova, R. and Sziklai-Laszlo, I. 2015. Study of Products from Neutrophilic Iron Bacteria by Prompt Gamma/Neutron Activation Analysis and X-Ray Diffraction. 8th Congress of the Balkan Geophysical Society, 5 - 8 October 2015, Chania, Crete, Greece, EAGE, 26980.
7. Angelova, R., Iliev, M., Slavov, L., Koutzarova, T., Closset, R., Nedkov, I. and Groudeva, V. 2015. Formation of artificial sheaths of *Leptothrix* sp. under laboratory conditions. J BioSci Biotech 165-170. ISSN: 1314-6246
8. Недков, И., Славов, Л., Благоев, Б., Ангелова, Р., Крежов, К., Грудева, В. 2015. Нови материали на базата на биогенни железни оксиди/хидроксиди за приложение в магнителектрониката. Списание на БАН 5:15-23. ISSN 0007-3989
9. Nedkov, I., Groudeva, V., Angelova, R., Iliev, M. and Slavov, L. 2016. New iron oxides/hydroxides biomaterials for application in electronics and medicine. In Proceeding of XIII International scientific congress "Machines. Technologies. Materials. 2016", Summer session: 14-17.09.2016, Varna, Bulgaria, 24(210):4-7. ISSN 1310-3946

#### **Публикации в списания с импакт ранг**

1. Angelova, R., Blagoev, B., Slavov, L., Iliev, M., Groudeva, V. and Nedkov I. 2014. Biogenic oxides from neutrophilic iron bacteria and possibilities for application in the nanotechnology. INERA Workshop of ISCMP2014, Journal of Physics: Conference Series 559 012019, doi:10.1088/1742-6596/559/1/012019. SJR: 0.231

#### **Публикации в списания с импакт фактор**

1. Angelova, R., Groudeva, V., Slavov, L., Iliev, M., Nedkov, I., Sziklai-László, I. and Krezhov, K. 2015. Instrumental neutron activation analysis of iron products from natural and laboratory cultivated *Sphaerotilus – Leptothrix* bacteria. J Biol Phys 41(4):367-375, doi: 10.1007/s10867-015-9384-1. IF=1.394
2. Nedkov, I., Slavov, L., Angelova, R., Blagoev, B., Kovacheva, D., Abrashev, M.V., Iliev, M. and Groudeva, V. 2016. Biogenic nanosized iron oxides obtained from cultivation of iron bacteria from the genus *Leptothrix*. J Biol Phys 42(4):587-600. IF=1.394

3. Safarik I., Angelova R., Baldikova E., Pospiskova K. and Safarikova M. 2017. *Leptothrix* sp. sheaths modified with iron oxide particles: Magnetically responsive, high aspect ratio functional material. Mater Sci Eng C 71:1342-1346. IF=3.420
4. Angelova, R., Baldikova, E., Pospiskova, K., Safarikova, M., Safarik, I. 2017. Magnetically modified sheaths of *Leptothrix* sp. as an adsorbent for Amido black 10B removal. J Magn Magn Mater 427:314-319. IF=2.357

## УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИЯТА

1. Angelova, R., Slavov, L., Iliev, M., Blagoev, B., Kovacheva, D., Abrashev, M., Nedkov, I. and Groudeva, V. Biogenic iron oxides produced by neutrophilic iron-oxidizing bacteria under laboratory conditions. European Biotechnology Congress, 16-18 May 2013, Bratislava, Slovakia. doi: 10.1016/j.copbio.2013.05.334 IF=8.93
2. Angelova, R., Balabanova, E., Slavov, L., Iliev, M., Blagoev, B., Kovacheva, D., Groudeva, V. and Nedkov, I. Application of electron-micrograph image analysis for nanostructures with biogenic origin. International conference of young scientists, 13-16 June 2013, Plovdiv, Bulgaria.
3. Angelova, R., Iliev, M. and Groudeva, V. Quantitative and qualitative assessment of neutrophilic iron bacteria of the group *Sphaerotilus – Leptothrix*. International conference of young scientists, 13-16 June 2013, Plovdiv, Bulgaria.
4. Angelova, R., Nedkov, I., Slavov, L., Iliev, M., Blagoev, B., Buchkov, K. and Groudeva, V. Magnetic properties and structure of biogenic subproducts of the *Sphaerotilus-Leptothrix* group bacteria metabolism. Second national congress on physical sciences, 41<sup>st</sup> National conference on physics education matters, 25-29 September 2013, Sofia, Bulgaria.
5. Angelova, R., Iliev, M., Mitova, M. and Groudeva V. Optimization of the cultivation of neutrophilic iron bacteria from the group *Sphaerotilus – Leptothrix*. 8<sup>th</sup> Balkan Congress of Microbiology, Microbiologia Balkanica, 02-05.10.2013, Veliko Tarnovo, Bulgaria.
6. Angelova, R., Slavov, L., Blagoev, B. and Iliev, M. Neutrophilic iron-oxidizing bacteria *Sphaerotilus-Leptothrix* materials for application in nano and biotechnologies. International Conference "Bioscience - development and new opportunities" – Kliment's days, 20-22.11.2013, Sofia, Bulgaria.
7. Veleva, S., Angelova, R., Stoyanov, L., Groudeva, V., Kovacheva, D., Mladenov, M. and Raicheff, R. Biogenic iron oxide-based nanocomposite electrodes for hybrid battery-supercapacitor systems. 15<sup>th</sup> International Workshop on Nanoscience and Nanotechnology, 21 – 23.11.2013, Sofia, Bulgaria.
8. Angelova, R., Groudeva, V., Nedkov, I., Sziklai-László, I. and Krezhov, K. INAA study of synthetic and natural iron bacteria products. The Second International Conference on Radiation and Dosimetry in Various Fields of Research, 27 – 30 May 2014, Niš, Serbia.
9. Angelova, R., Iliev, M., Mitova, M., Voynova, V., Tasheva, L., Slavov, L., Groudeva, V. and Antonova-Nikolova, S. Optimization the cultivation of neutrophilic iron bacteria in laboratory conditions. Third Balkan Scientific Conference of Biology, 30 May – 1 June 2014, Plovdiv, Bulgaria.
10. Angelova, R., Iliev, M., Slavov, L., Tasheva, L., Mitova, M. and Groudeva, V. Biodiversity of neutrophilic iron bacteria in water habitats in Vitosha Mountain. Jubilee Conference: "40 Years of environmental education, conservation and restoration of the environment" at University of forestry, 12 - 13 June 2014, Sofia, Bulgaria.

11. Nedkov, I., Angelova, R., De Grave, E., Slavov, L., Iliev, M., Blagoev, B., Kovacheva, D. and Groudeva, V. Magnetic properties of nanosized iron containing biogenic materials after cultivation of bacteria from the genus *Leptothrix* under laboratory conditions. 11<sup>th</sup> International Conference on Nanosciences & Nanotechnologies, 08 – 11 July 2014, Thessaloniki, Greece.
12. Angelova, R., Slavov, L., Iliev, M., Blagoev, B., Nedkov, I. and Groudeva, V. Biogenic oxides from neutrophilic iron bacteria and possibilities for application in the nanotechnology. INERA WORKSHOP: Transition Metal Oxide Thin Films-functional Layers in “Smart windows” and Water Splitting devices: Technology and Optoelectronic properties, 04 – 06 September 2014, Varna, Bulgaria.
13. Angelova, R., Slavov, L., Iliev, M., Mitova, M., Blagoev, B., Nedkov, I. and Groudeva, V. Biogenic iron oxides from *Leptothrix* sp. for application in the bionanotechnology. First National Conference of Biotechnology, 17-18.10.2014, Sofia, Bulgaria.
14. Krezhov, K., Angelova, R. and Sziklai-Laszlo, I. Study of Products from Neutrophilic Iron Bacteria by Prompt Gamma/Neutron Activation Analysis and X-Ray Diffraction. 8th Congress of the Balkan Geophysical Society, 5 - 8 October 2015, Chania, Crete, Greece.
15. Angelova, R., Slavov, L., Iliev, M., De Grave, E., Blagoev, B., Nedkov, I. and Groudeva, V. Characteristics of iron oxides obtained via laboratory cultivation of *Leptothrix* bacteria. 9th Balkan Congress of Microbiology - Microbiologia Balkanica, 22-24 October 2015, Thessaloniki, Greece.
16. Angelova, R., Iliev, M., Slavov, L., Koutzarova, T., Closset, R., Nedkov, I. and Groudeva V. Formation of artificial sheaths of *Leptothrix* sp. under laboratory conditions. Second national conference for young scientists “Biological sciences for a better future” –30-31 October 2015, Plovdiv, Bulgaria.
17. Nedkov, I., Slavov, L., Angelova, R., Blagoev, B. and Groudeva, V. Biogenic iron oxides/hydroxides nanosized materials for application in magnetoelectronics. COST TO-BE Meeting, 6-8 April 2016, University of Warwick, UK.
18. Angelova, R., Baldikova, E., Pospiskova, K., Safarikova, M. and Safarik, I. Magnetically modified sheaths of *Leptothrix* sp. as an adsorbent for Amido black 10B removal. 11<sup>th</sup> International Conference on the Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers, May 31 - June 4, 2016, Vancouver, Canada.
19. Nedkov, I., Groudeva, V., Angelova, R., Iliev, M. and Slavov, L. New iron oxides/hydroxides biomaterials for application in electronics and medicine. XIII International scientific congress “Machines. Technologies. Materials. 2016”, Summer session: 14-17.09.2016, Varna, Bulgaria.
20. Angelova, R., Iliev, M., Groudeva, V., Slavov, L. and Nedkov, I. Bio-tubular structures containing monophasic ferric phosphate hydroxide obtained through the laboratorial nanotechnology. COST TO-BE FALL MEETING, 27-28 September 2016, Ljubljana, Slovenia.

## УЧАСТИЯ В ПРОЕКТИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИЯТА

1. Нови материали за електрониката на базата на биогенни оксиди“ - ДИД02/38/09МОМН – 10.2010 – 12.2015
2. Характеристика на неутрофилни железобактерии, изолирани от естествени местообитания” - № 165/04/2014, Изследователски проект в подкрепа на докторантите към Софийски Университет „Свети Климент Охридски”: 165/04/2014
3. Получаване и изследване на наноразмерни биогенни железни оксиди/оксихидроксида за приложение в катализа, електрониката и екологията Т02-17/12.12.2014 –

## ЦИТАТИ

***Angelova, R., Blagoev, B., Slavov, L., Iliev, M., Groudeva, V. and Nedkov, I. 2014. Biogenic oxides from neutrophilic iron bacteria and possibilities for application in the nanotechnology. In Journal of Physics: Conference Series 559(1):012019):***

**Цитирана от:**

1. Shopska, M., Paneva, D., Kadinov, G., Todorova, S., Fabián, M., Yordanova, I., Cherkezova-Zheleva, Z. and Mitov, I. 2016. Composition and catalytic behavior in CO oxidation of biogenic iron-containing materials. *React Kinet Mech Cat* 118(1):179-198.

2. Shopska, M., Paneva, D., Kadinov, G., Cherkezova-Zheleva, Z., Mitov, I. and Iliev, M., 2016. Study on the composition of biogenic iron-containing materials obtained under cultivation of the *Leptothrix* sp. on different media. *Appl Biochem Biotechnol* 1-17.

***Angelova, R., Groudeva, V., Slavov, L., Iliev, M., Nedkov, I., Sziklai-László, I. And Krezhov, K. 2015. Investigation of iron-containing products from natural and laboratory cultivated Sphaerotilus-Leptothrix bacteria. J Biol Phys 41(4):367-375.***

**Цитирана от:**

1. Shopska, M., Paneva, D., Kadinov, G., Todorova, S., Fabián, M., Yordanova, I., Cherkezova-Zheleva, Z. and Mitov, I. 2016. Composition and catalytic behavior in CO oxidation of biogenic iron-containing materials. *React Kinet Mech Cat* 118(1):179-198.

2. Kunoh, T., Hashimoto, H., McFarlane, I.R., Hayashi, N., Suzuki, T., Taketa, E., Tamura, K., Takano, M., El-Naggar, M.Y., Kunoh, H. and Takada, J. 2016. Abiotic deposition of Fe complexes onto *Leptothrix* sheaths. *Biology*, 5 (2), art. no. 26.

***Angelova, R., Slavov, L., Iliev, M., Mitova, M., Blagoev, B., Nedkov, I. and Groudeva V. 2015. Biogenic iron oxides from labor atory cultivated Leptothrix sp. for application in the bionanotechnology. Annuaire de l'Université de Sofia - St. Kliment Ohridski, First National Conference of Biotechnology 100(4):231-238.***

**Цитирана от:**

1. Квартенко, О.М. 2016. Використання осадів станцій біологічного знезалізнення для осаждения іонів важких металів із зворотних стоків гальванічного виробництва. Матеріали ХІХ Міжнародної науково-практичної конференції „Екологія. Людина. Суспільство”, м. Київ, Україна 93-95.