

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ

Институт по микробиология “СТЕФАН АНГЕЛОВ”



**Биодеградация на ароматни и полиароматни
замърсители на околната среда от плесени,
изолирани от Антарктически почви**

Катя Цветанова Стоянова

Автореферат

На дисертационен труд
за придобиване на образователна и научна степен „доктор“ по научна
специалност “Микробиология”, шифър 01.06.12

Научен ръководител:

доц. д-р Златка Алексиева

Консултант:

гл. ас. д-р Мария Гергинова

София, 2019

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ

Институт по микробиология “СТЕФАН АНГЕЛОВ”

**Биодеградация на ароматни и полиароматни
замърсители на околната среда от плесени,
изолирани от Антарктически почви**

Катя Цветанова Стоянова

АВТОРЕФЕРАТ

На дисертационен труд
за придобиване на образователна и научна степен „доктор” по научна
специалност “Микробиология”, шифър 01.06.12

Научен ръководител:

доц. д-р Златка Алексиева

Консултант:

гл. ас. д-р Мария Гергинова

София, 2019

Дисертационният труд съдържа 180 страници, 7 таблици и 95 фигури. Библиографската справка съдържа 498 заглавия, от които 7 на кирилица и 491 на латиница. Експерименталната работа е извършена в Института по микробиология „Стефан Ангелов“, БАН.

Дисертационният труд е обсъден и насочен към защита на заседание на 18.12.2018.

Официалната защита ще се проведе на _____ от _____ ч. в заседателната зала на Института по микробиология „Стефан Ангелов“, ул. „Акад. Г. Бончев“ 26, на открито заседание на Научното жури по защита в следния състав.

1. Доц. Пенка Петрова
2. Доц. Златка Алексиева
3. Проф. Мария Ангелова
4. Проф. Нели Георгиева, ХТМУ
5. Проф. Тодор Кантарджиев, НЦЗПБ

Използвани съкращения и символи:

ДНК – дезоксирибонуклеинова киселина

НАДФ – никотинамид аденин динуклеотид фосфат

НАДФН – никотинамид аденин динуклеотид фосфат, редуциран

ПАВ – полиароматен въглеродород

РНК – рибонуклеинови киселина

ФАД – флавин аденин динуклеотид

ATSOR (*Agency for Toxic Substances and Disease Registry*) – Американска Агенция за токсичните съединения и регистър на заболяванията

BLAST (*The Basic Local Alignment Search Tool*) – програма за търсене и сравнение на нуклеотидни и протеинови последователности в бази данни

ClustalW – програма за сравняване на множество нуклеотидни и протеинови последователности и откриване на най-близките сходства

GCMS – газхроматографска-масспектрометрия

HMW ПАВ – високомолекулен полиароматен въглеродород

LMW ПАВ – нискомолекулен полиароматен въглеродород

LiP – лигнин пероксидаза

MGP - Manufactured Gas Plant

MnP – манган пероксидаза

NCBI (*National Center for Biotechnological Information*)– национален център за биологична информация

PCR – полимеразна верижна реакция

SDS – натриев додецил сулфат

SSC – буфер с натриев хлорид и натриев цитрат

UV – ултравиолетов спектър

YEP (Yeast Extract Pepton) – комплексна среда за култивиране на фунги

YEPD (Yeast Extract Pepton Dextrose) – комплексна среда за култивиране на фунги с глюкоза

1. УВОД

Нарастващото замърсяване на околната среда води до прогресивно влошаване на качеството на природните ресурси, най-важният, от които е водата. Въпросът с чистата вода изисква внимателно управление и опазване на. В резултат от многогодишното натрупване на ксенобиотици, навсякъде по света продължават да възникват многобройни райони замърсени с опасни. Главен източник на тези замърсявания е производството на петролни продукти. Ароматните съединения, към които принадлежи фенолът и неговите производни, в състава им варират от 3 до 30%. Високи концентрации на тези съединения се съдържат най-често в промишлени отпадъчни води, напр. от заводите за преработка на нефт и инсталациите за добив и обработка на въглища. Тези наблюдения заставят световната научна област да търси ефективни мерки за възстановяване на околната среда с цел опазване на човешкото и природното здраве.

Биотехнологичният подход е един от най-евтините и ефективни подходи при пречистването на засегнати местообитания с ароматни замърсители. Различни фенол-деградиращи микроорганизми се проучват интензивно с цел иновиране и подобряване на биодеградиационните технологични процеси. Въпреки това повечето проучвания в световен аспект са посветени на прокариотни организми. Използването на фунгални щамове за деградация е относително непокътната сфера.

Сериозен и нерешен проблем представляват и полицикличните ароматни съединения, чийто траен негативен ефект в биосферата не буди съмнение. Полициклични ароматни хидрокарбони (ПАХ) са могли да се акумулират в районите на Антарктика, там където са възниквали нефтени разливи. Нафталенът и негови метилни деривати са доминиращите ПАХ, открити при изследвания на повърхностни и подповърхностни почвени проби от тези места.

Откриването на нови подходящи биодеградатори, които проявяват и запазват активността си в неблагоприятни условия, като варираща в широк диапазон температура, отсъствие на лесно усвоими субстрати, утилизация на токсични съединения и толерантност по отношение на други неблагоприятни фактори е от решаващо значение за подобряване на съвременните биоремедиационни подходи и технологии. В наше време, ензимите, с температурен оптимум и висока активност при ниски температури, привличат вниманието поради потенциала им за приложение в екологичната биотехнология при *in situ* ремедиация на почва и вода в райони с ниска и/или променлива температура.

За решаването на тези проблеми все по-важно значение имат съвременните молекулярни методи за селектиране и анализ на катаболитния потенциал на нови представители на микрофлората от райони, предполагащи наличието на микроорганизми с уникални характеристики. Гените, кодиращи катаболитни ензими като метан монооксигеназа, катехол диоксигеназа, фенол хидроксилаза и др. са обект на идентификация при опитите да се надникне в генетичното разнообразие на катаболитните популации. Понастоящем може да се очаква, че подобна информация ще допринесе за разбирането и напредъка на биоремедиацията.

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Основната цел на предлаганата тема е изследване на способността на еукариотни микробни щамове, изолирани от антарктически почви, да разграждат токсични ароматни и полиароматни замърсители на околната среда.

За изпълнение на поставената цел бяха формулирани следните задачи:

- 3.1. Изследване на възможностите на щамове Антарктически фунги да разграждат и усвояват фенол, хидроксилни, метилни и нитро производни на фенол.
- 3.2. Изследване на възможностите на щамове Антарктически фунги да разграждат и усвояват ПАВ – нафтален, антрацен и фенантрен.
- 3.3. Проучване и анализ на ензими, пряко участващи в процесите на деградация на ароматни съединения при Антарктически щамове фунги.

3.4. Идентифициране и характеризиране на катаболитни гени, свързани с деградационния потенциал на изследваните щамове по отношение на ароматни и полиароматни замърсители на околната среда.

3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

3.1. Микроорганизми

Седем щама плесени, изолирани от почвени проби от о-в Ливингстон – Южни Шетлански острови, Антарктида, са проучвани в настоящата разработка: *Aspergillus glaucus* AL1, *Aspergillus fumigatus* AL3, *Penicillium commune* AL5, *Aspergillus fumigatus* AL9, *Alternaria maritima* AL10 и *Aspergillus fumigatus* AL15.

3.2. Хранителни среди

- **Богата хранителна среда бирен агар BA** – Universal Beer Agar (Fluka).
- **Богата хранителна среда Yeast Extract Peptone Dextrose/Phenol (YEPD/YEPPh)** – съставни части за 1 L: дрождев екстракт (Difco) 10 g, бактопептон (Difco) 20 g, глюкоза 10 g или фенол 0.3 g.
- **Минимална хранителна среда Czapek Dox** – съставни части за 1 L: NaNO_3 – 2 g, KH_2PO_4 – 1 g, KCl – 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.5 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.01 g.

Твърдите хранителни среди са със същия състав с добавено количество агар 15 g за 1 L.

3.3. Буфери и химикали

- **Калиево-фосфатен буфер:** 0.05M KH_2PO_4 , 0.05M K_2HPO_4 , pH = 7,5
- **1 M Трис** – HCl, pH = 7.6; 1 M Трис – HCl, pH = 8.3
- **ТВЕ буфер:** 0.04M Трис - HCl, 0.04M H_3BO_3 , 0.002M EDTA, pH 8.0
- 20% Амониев пероксид сулфат $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ pH 7
- 5% Амониев хлорид pH 9,3
- **Буфер за лизиране:** 50 mM Tris, 25 mM EDTA, 500mM NaCl, 1% SDA, pH7.5
- **ТЕ буфер:** 10mM Трис - HCl, 1mM EDTA, pH = 7.5
- **СТЕР буфер** 1ml : 50 μ l 1M TRIS, 100 μ l 0.5M EDTA, 50 μ l 1% SDS, 800 μ l d H₂O – буферът се кипва на спиртна лампа и се използва свеж.
- 3,5% пирамидон

Използваните материали са снабдени от Sigma Aldrich, MO и Merck-Schuchardt, Германия.

3.4. Условия на култивиране

Периодичното култивиране на щамовете е извършвано в солева минерална и богата хранителна среди, съответно течни или агарови. Като въглероден източник са използвани глюкоза, фенол и фенолни деривати в подходящи концентрации. Основните параметри на култивиране са: температура 10°C и 23°C и аериране на клатачен апарат при 400 об/мин, в Ерленмайерови колби с подходящ обем хранителна среда. Щамовете бяха съхранявани върху полегат бирен агар при 4°C.

Спорорвата суспензия, използвана за посев в течна хранителна среда.

3.5. Генетичен анализ

- **Изолиране на ДНК от мицел на плесенни гъби**, чрез екстракция с фенол и хлороформ.
- **Електрофоретичният анализ на получените ДНК фрагменти** е осъществен чрез агарозна електрофореза в гелове с подходяща концентрация на агароза (Sigma Aldrich): за тотална геномна ДНК – 0.8 %, за анализ на PCR-фрагменти – 2 %. Времето за провеждане на електрофорезите варира от 1 до 2 часа при напрежение 80 V.

- **PCR-анализ**, при който се използват puReTaq Ready-To-Go PCR Beads” на фирмата “GE Health Care”. Праймерите и условията на реакцията, посочени в таблица 2 са създадени на базата на ДНК-секвенция за детекция на гени, кодиращи фенол хидроксилаза и катехол диоксигеназа в щам *Aspergillus fumigatus* Af293 (NCBI Acc. No. XM_744333)
- **Секвениране на ДНК е проведено в ABI Prizm 310, Applied Biosystems. PCR- продуктите** за секвениране са обработени в MacroGen.
- **Сравнителен секвенционен анализ** – За корекции, филогенетичен анализ и сравнение с базата данни на NCBI са използвани програмите Sequence Scanner V1.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), BLAST, ClustalW 2 и ExPASy Proteomics Center.

3.6 Аналитични методи

Таблица 1. Използвани методи за анализ

МЕТОД		АПАРАТИ
Определяне на суха биомаса, mg/ml	Гравиметричен метод	KERN DBS Версия 1.1 03/2013, Германия
Получаване на осветлен клетъчен лизат	Механично стриване с кварцов пясък	
Концентрация на фенол, катехол, резорцинол, <i>o</i> -, <i>m</i> - и <i>p</i> -крезол, g/l	Метод на Лурие, 1973	спектрофотометър Jenway 6305, UK
Концентрация на хидро-хинон, g/l	Метод на Фолин	спектрофотометър Jenway 6305, UK
Концентрация на ПАВ, g/l	Газхроматографски масспектрометричен анализ	– Hewlett Packard 7890
Фенолхидроксилазна активност, U/mg P	Метод на Neujahr and Gaal, 1973	спектрофотометър Jenway 6305, UK
Катехол-1,2-диоксигеназна активност, U/mg P	Метод на Varga and Neujahr, 1970	спектрофотометър Jenway 6305, UK
Концентрация на белтък, mg/ml	Метод на Bradford, 1976 Метод на Lowry, 1951	спектрофотометър Jenway 6305, UK

*Всички резултати, получени при аналитичните методи са представени като средни аритметични стойности от три експеримента.

Таблица 2. ДНК – олигонуклеотидни праймери и условия за PCR – анализ.

Праймери	Секвенция (5' → 3')	PCR условия
За фенол хидроксилаза pPHF1f pPHF3r pPHF3f pPHF4r pPHF5f pPHF6r	ATGATGGGTCTTGAGGTCTCAAGG GTAGATTGTCCACGATCGC GCGACTGGTGGACAATCTAC CGTAGTTGCGCAGCTGCTCATA TATGAGCAGCTGCGCAACTAC TCAGCGCGTGAAGATGGGATG	инициация, 95°C, 5 мин; амплификация 35 цикли, 95°C, 30 s; 54°C, 30 s; 72°C, 1 мин, елонгация, 72°C, 5 мин.
За катехол диоксигеназа AFKF1 AFKR1 AFKF2 AFKR2 AFKF3 AFKR3 AFKF4 AFKR4	GCTACTCATCGATTTGACC GCGGCCTCATCAGCAAGCTT TTGTCTGTGACGTGATCGGG TGCCACACCTCCACCGTCGC TCATGCACGGCCGGGTGATC GGGTGTCGGTCCATGAGCTC GTCCGACGCCGTATCCTGTT CTACGCCTGGTCCGCCACCA	инициация, 95°C, 5 мин; амплификация 35 цикли, 95 °C, 30 s; 60°C, 30 s; 72°C, 60 s; елонгация, 72°C, 5 мин.

4. РЕЗУЛТАТИ

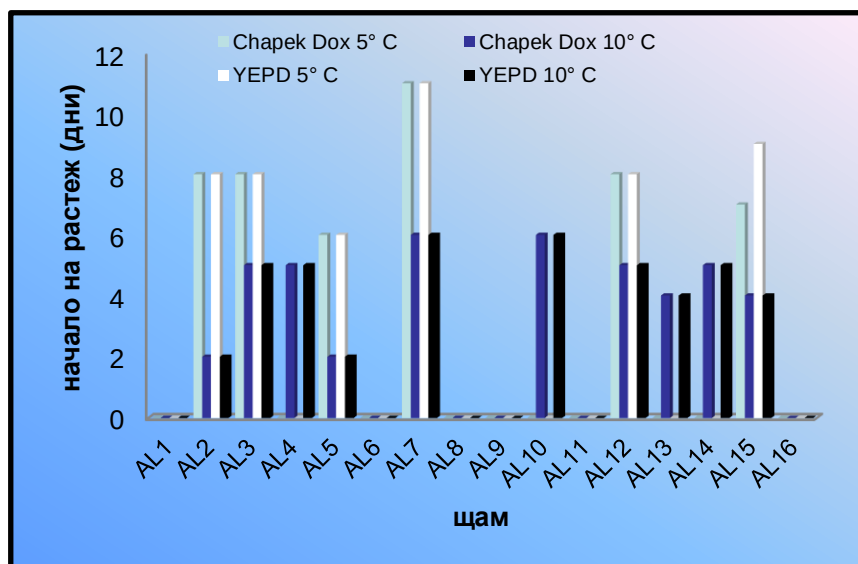
4.1. Изследване на толерантността на антарктически щамове фунги по отношение присъствието на моно- и полиароматни съединения в растежната среда.

В началните изследвания бе установено, че всички изследвани щамове са способни да се развиват в присъствие на фенол, при наличие на глюкоза. При изключване на глюкозата от хранителната среда – шест от изследваните щамове са способни да усвояват съществени количества фенол, като 5 от тях са представители на род *Aspergillus* и 1 – на род *Penicillium*. Щам *Penicillium* sp. AL11 не е способен да расте дори при незначителни концентрации на фенол в средата, а останалите 5 щамове растат и се развиват при ниски концентрации фенол.

От проведените експерименти за установяване на толерантност към полиароматни съединения (нафтаген, антрацен и фенантрен), се установи, че 7 от изпитаните щамове растат добре в среда, съдържаща антрацен. Това са щамове *A. glaucus* AL1, *P. rugulosum* AL7, *A. maritima* AL10, *Penicillium* sp. AL11, *Lecanicillium* AL12, *Mucor* sp. AL13 и *P. waksmanii* AL14. Същите седем щамове, както и щам *P. commune* AL2 се развиват добре в среда, съдържаща нафтаген. Единствено щам *A. maritima* AL10 показва добър растеж и в хранителна среда, включваща фенантрен.

4.2. Толерантност на изследваните щамове фунги към присъствие на фенол в средата, при ниски температури

Беше изследвана способността на 16-те щамове Антарктически фунги да растат и се развиват при ниски температури от 5°C и 10°C. Резултатите показаха, че повечето щамове са способни да растат при 10°C, а част от тях растат и при 5°C, но всички от тях са способни да растат и при 23°C, което ги характеризира като психротрофи. Данните за дните, необходими за начало на растеж на различните щамове, върху двете използвани среди, при двете температури са показани на Фиг. 1.

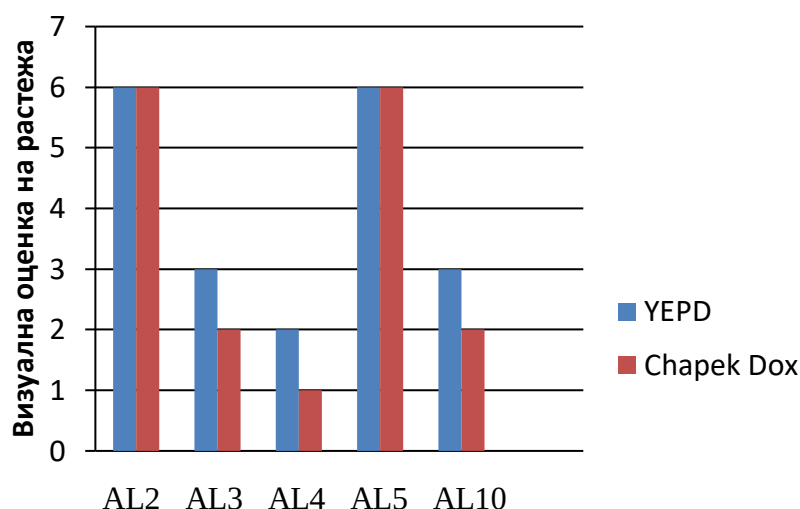


Фиг. 1. Сравнение на растежа на 16 щамове фунги при 5°C и 10°C на богата и бедна среда, съдържащи 1% глюкоза.

След извършените предварителни проучвания на шестнайсетте щамове фунги, изолирани от антарктически почви беше направена селекция от шест щамове, въз основа на техните способности да растат и да се развиват при температури от 23°C и 10°C и да усвояват фенол, монофенолни производни и полиароматни въглеводороди, с които продължиха проучванията в настоящата дипломна работа. Това са щамове: *A. glaucus* AL1, *A. fumigatus* AL3, *P. commune* AL5, *A. fumigatus* AL9, *A. maritima* AL10 и *A. fumigatus* AL15.

Две серии от експерименти бяха проведени, съответно на богата (YEP) и минимална (Chapek Dox) хранителна среда, целящи да се установи способността на 6-те подбрани

психротолерантни щама да растат при 10°C на среда, съдържаща 10 g/l глюкоза и 0.3 g/l фенол. Получените резултати са представени на Фиг. 2.



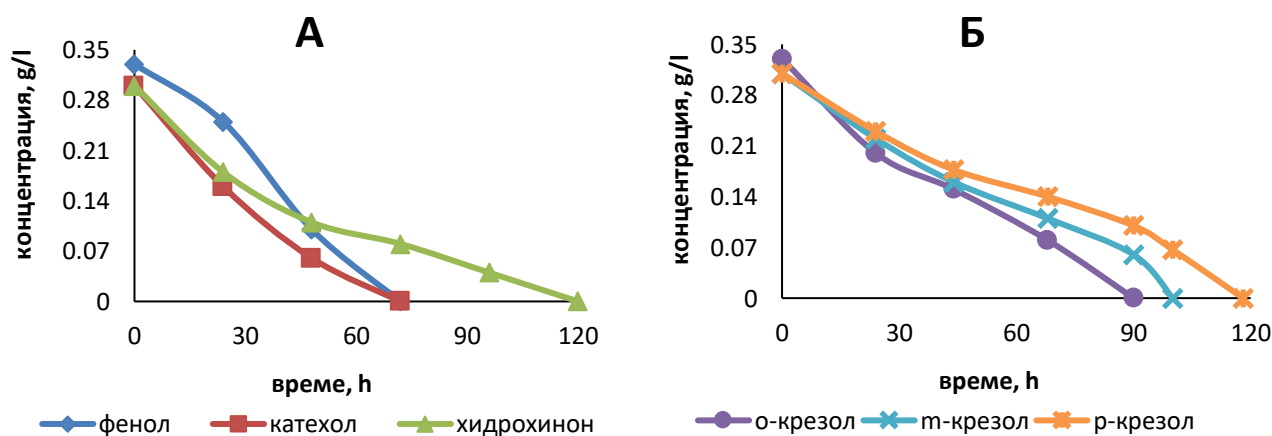
Фиг. 2. Растеж на 6 подбрани щама фунги на богатата и бедната хранителни среди, съдържащи 10 g/l глюкоза и 0.3 g/l фенол като източници на въглерод и енергия. Резултатите са представени като визуална оценка със степени на растеж от 0 до 6.

4.3. Деградация на фенол и монофенолни съединения от антарктически щамове фунги.

В деградационните експерименти бяха използвани фенол и негови моно-заместени производни: хидроксилни (резорцинол, катехол, хидрохинон), метилни производни (*o*-, *m*- и *p*- крезол), хлорни (*o*-, *m*- и *p*- хлорфенол) и нитро (*o*-, *m*- и *p*- нитрофенол), включени като единствени въглеродни субстрати в минерална среда Czapek Dox при 10°C и 23°C. Началните експерименти показаха, че изследваните щамове *A. glaucus* AL1, *A. fumigatus* AL3, *P. commune* AL5, *A. fumigatus* AL9, *A. maritima* AL10 и *A. fumigatus* AL15 не са способни да разграждат и усвояват нито един от хлорните и нитро- производни на фенола.

Беше подбрана концентрация от 0.3 g/l за всяко едно от използваните ароматни съединения, което дава възможност да бъдат сравнявани получените с всяко едно от тях резултати.

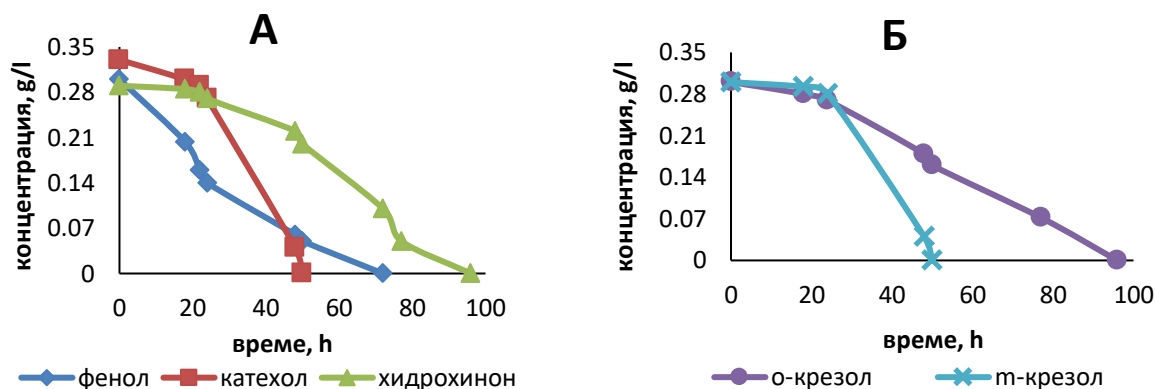
Щам *A. glaucus* AL1, който се развива само при 23°C може да разгражда и асимилира напълно добавените субстрати за период от 18-96 часа. Единствено този щам е способен да разгражда и трите метилирани производни на фенола (Фиг. 3). Натрупването на биомаса при тези експерименти е несъществено.



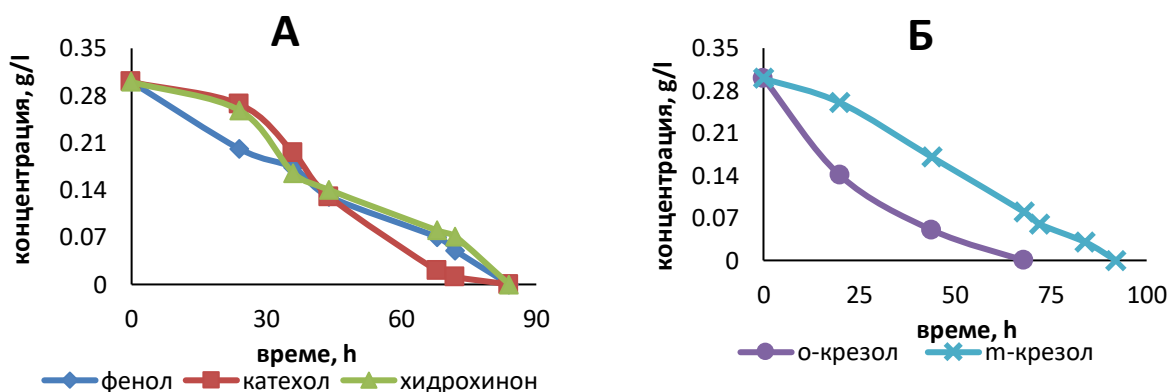
Фиг. 3. Деградационни криви при разграждане на фенол, хидроксилни (А) и метилирани монофеноли (Б) от клетки на щам *A. glaucus* AL1 в минерална среда (CD) при 23°C.

Другият мезофилен представител на род *Aspergillus* - щам *A. fumigatus* AL3 най-бързо разгражда катехол (за 48 ч.), и се оказа сред най-добрите деградатори на *m*-крезола (за 50 ч.) в настоящето проучване (Фиг. 4).

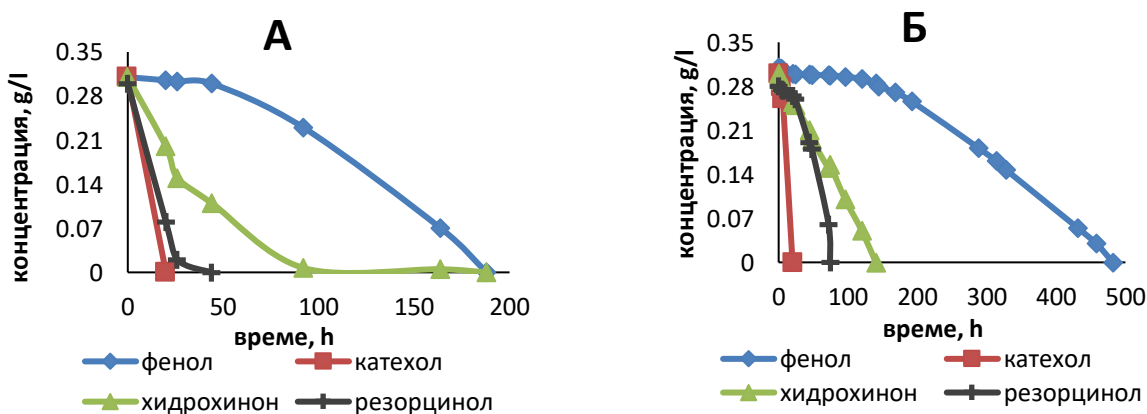
Щам *A. fumigatus* AL9 също проявява деградационните си качества в мезофилни условия - само при 23°C. От представените на Фиг. 5 резултати се вижда, че той разгражда фенол, катехол и хидрохинон и *o*-крезол практически за едно и също време, а *m*-крезол – в рамките на 100ч.



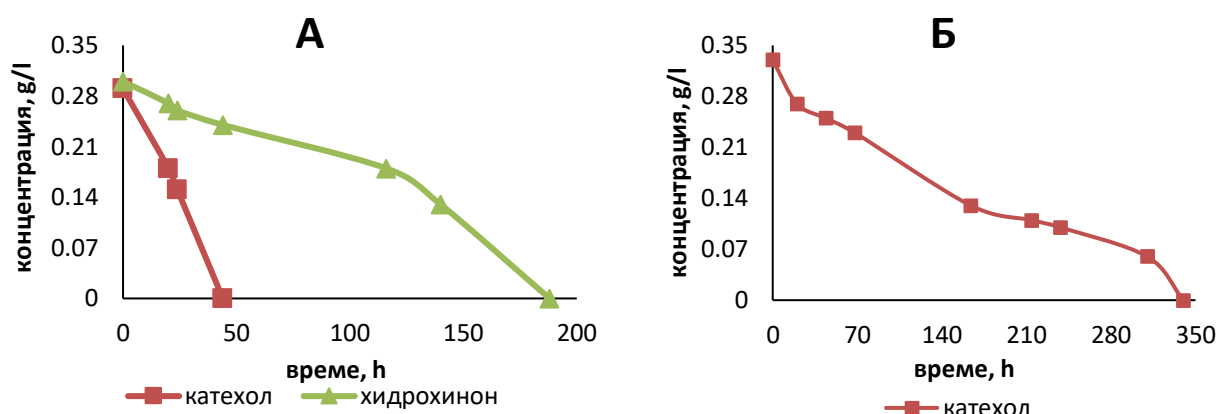
Фиг. 4. Деградационни криви при разграждане на фенол, хидроксиларни (А) и метиларни монофеноли (Б) от клетки на щам *A. fumigatus* AL3 в минерална среда (CD) при 23°C.



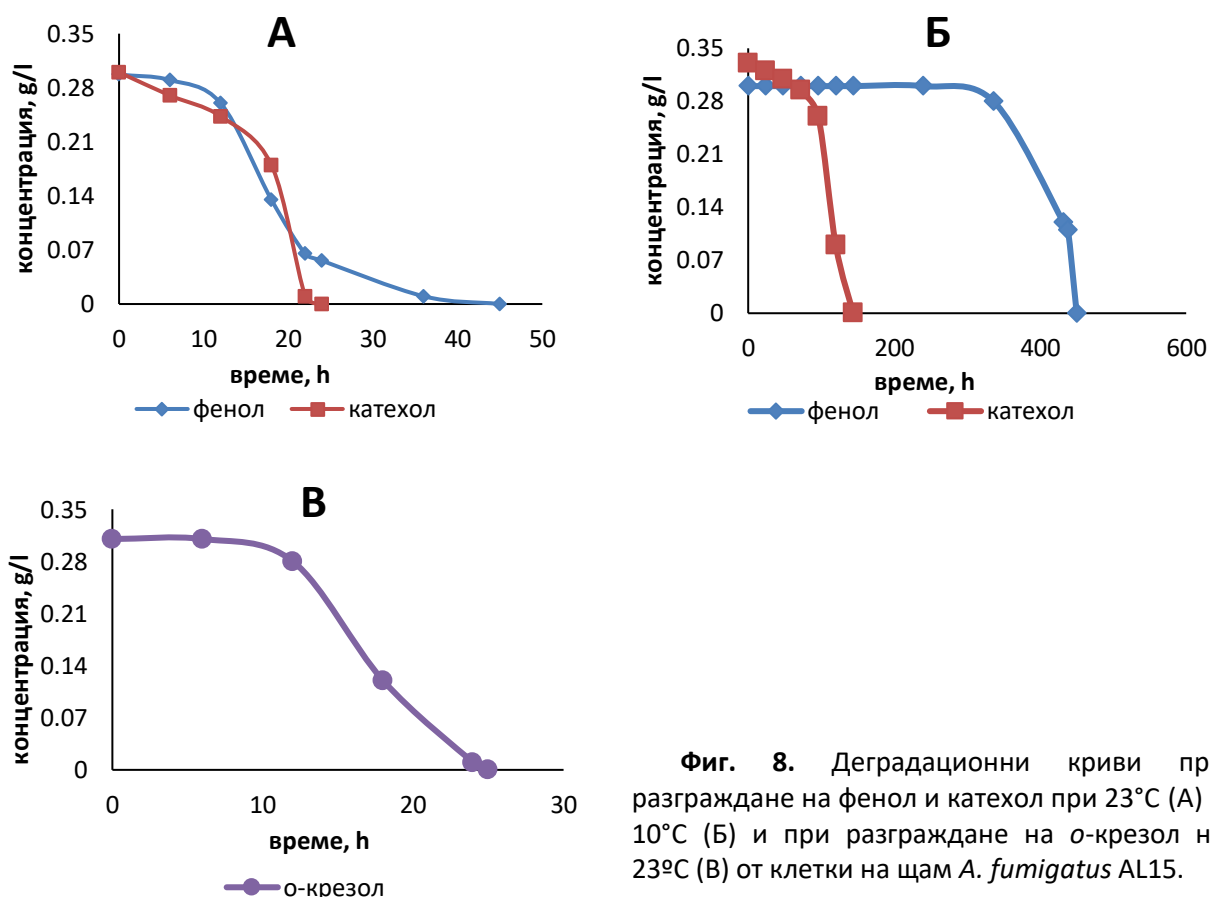
Фиг. 5. Деградационни криви при разграждане на фенол, хидроксиларни (А) и метиларни монофеноли (Б) от клетки на щам *A. fumigatus* AL9 в минерална среда (CD) при 23°C.



Фиг. 6. Деградационни криви при разграждане на фенол и хидроксиларни монофеноли от клетки на щам *P. commune* AL5 в минерална среда (CD) при 23°C (А) и 10°C (Б).



Фиг. 7. Деградационни криви при разграждане на фенол и хидроксилирани монофеноли от клетки на щам *A. maritima* AL10 в минерална среда (CD) при 23°C (А) и 10°C (Б).



Фиг. 8. Деградационни криви при разграждане на фенол и катехол при 23°C (А) и 10°C (Б) и при разграждане на *o*-крезол на 23°C (В) от клетки на щам *A. fumigatus* AL15.

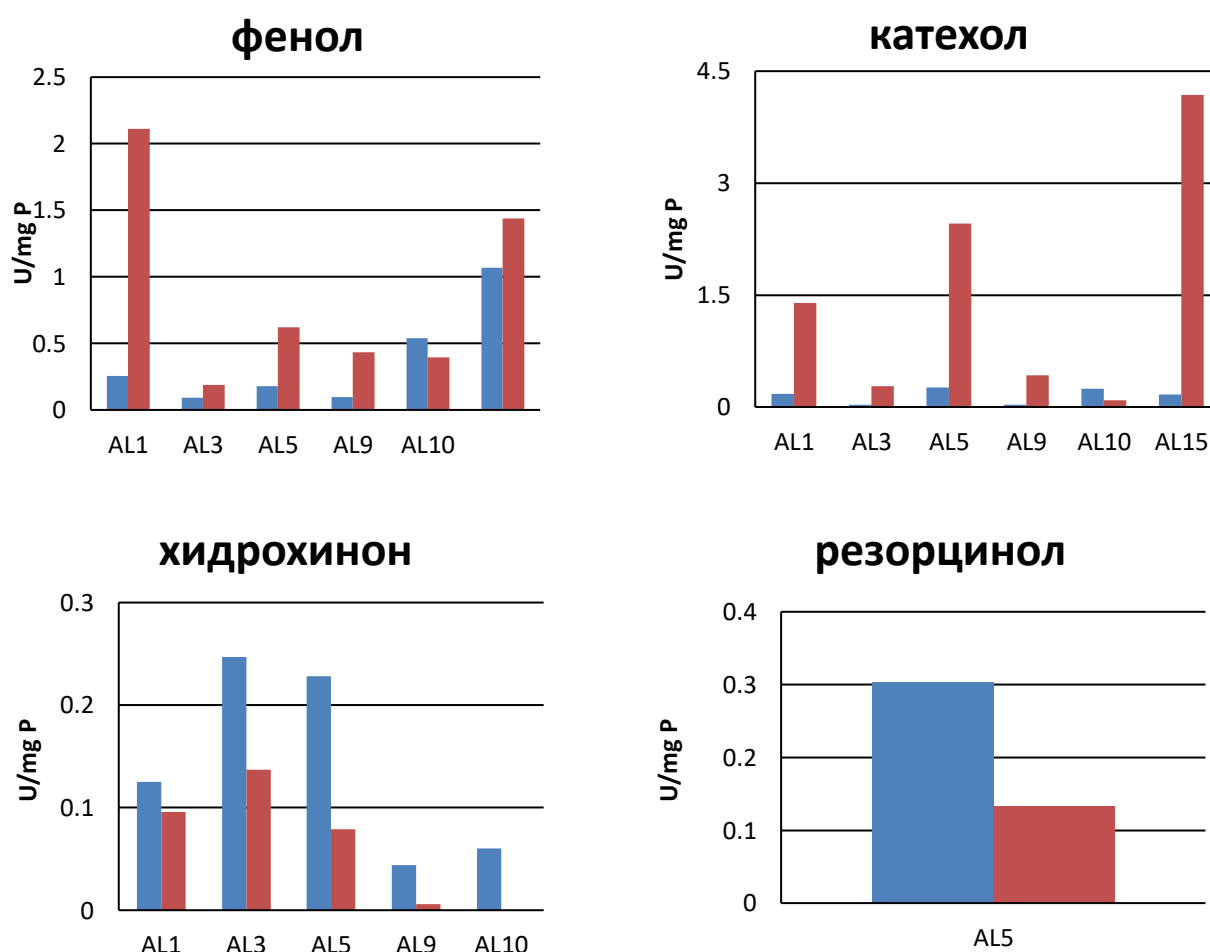
Щам *P. commune* AL5 показва капацитет да усвоява фенол и трите хидроксилирани монофенолни деривати по-бързо при 23°C, отколкото при 10°C (Фиг. 6). Най-бързо усвояващите се субстрати при двете използвани температури са катехол и резорцинол.

Пълна деградацията на катехол от щам *A. maritima* AL10 при 23°C беше отчетена на 44-тия час от култивирането, което нарежда този щам сред най-добрите биодеграданти на катехол в настоящия труд (Фиг. 7А). Получено беше и пълно разграждане на хидрохинон, макар и за по-дълго време (188ч.). Щамът се оказва способен да усвоява катехол на 10°C за 340ч (Фиг. 7Б).

Беше установено, че шам *A. fumigatus* AL15 е способен да усвоява 0.3 g/l фенол и катехол, като единствен въглероден източник и при двете прилагани температури (Фиг. 8А и Б). Единственият метилиран монофенолен субстрат, разграждащ се напълно при 23°C се оказа *o*-крезол, чието време за разграждане (25 ч.) беше най-кратко при мезофилни условия за всички щамове от настоящия труд.

4.4. Изследване на ключови ензимни активности в клетките на изследваните щамове при усвояване на монофенолни субстрати

Мицелът на шестте избрани щамове фунги: *A. glaucus* AL1, *A. fumigatus* AL3, *P. commune* AL5, *A. fumigatus* AL9, *Al. maritima* AL10 и *A. fumigatus* AL15, получени в течна минерална среда, съдържаща 0.3 g/l фенол, катехол, резорцинол, хидрохинон, *o*-, *m*- или *p*-крезол като единствен въглероден източник беше използван с цел както да се определи активността на двата ензима фенол хидроксилаза и катехол-1,2-диоксигеназа, така и да се открие влиянието на отделните въглеродни субстрати върху активността на двата вътреклетъчни ензима.

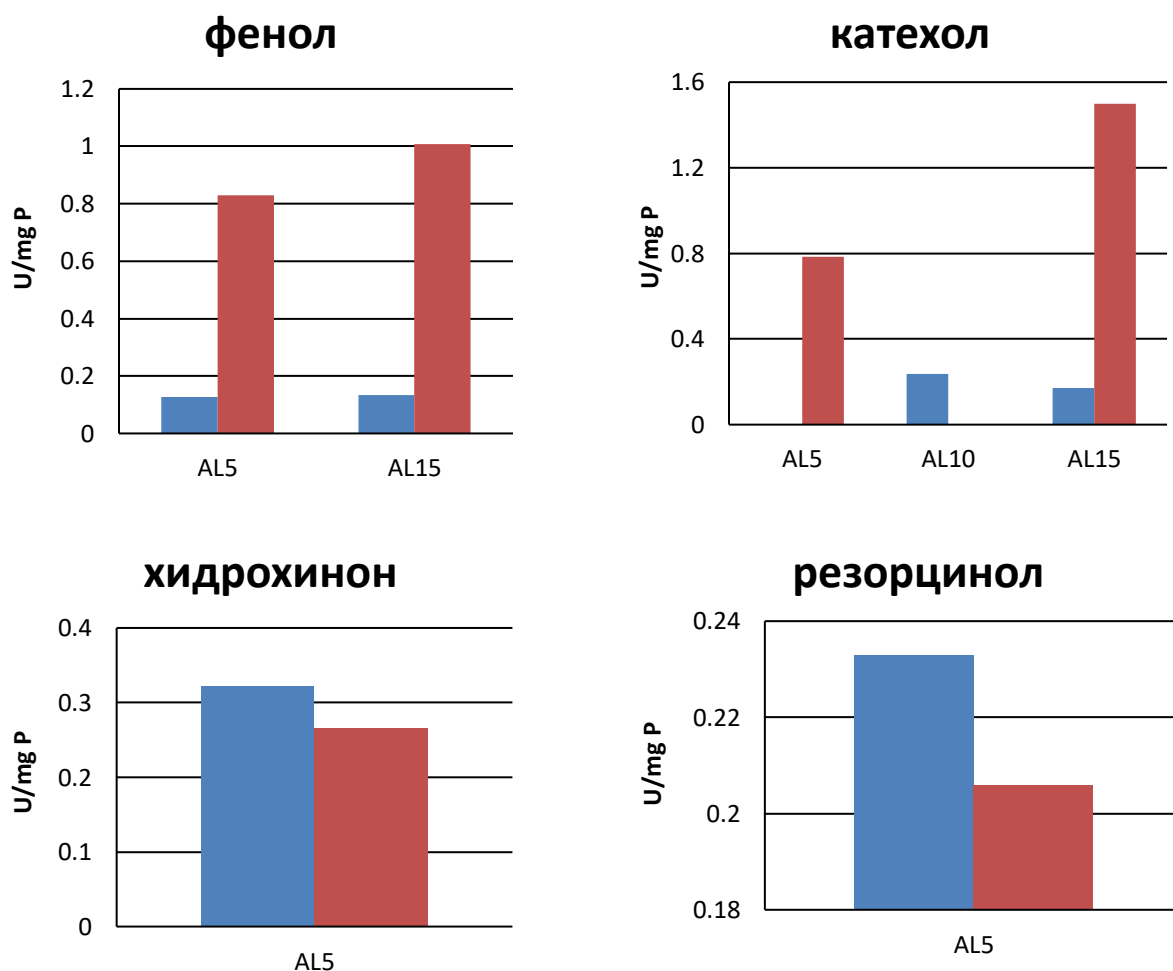


Фиг. 9. Фенол хидроксилазна (■) и катехол-1,2-диоксигеназна (■) активност в клетки на щамове *A. glaucus* AL1, *A. fumigatus* AL3, *P. commune* AL5, *A. fumigatus* AL9, *A. maritima* AL10 и *A. fumigatus* AL15, култивирани в среда съдържаща фенол, катехол, хидрохинон или резорцинол при 23°C.

От представените резултати се вижда, че в клетки на представителите на *Aspergillus* и *Penicillium*, култивирани в среда с фенол или катехол, като въглеродни източници, при 23°C, катехол-1,2-диоксигеназната активност е по-висока от фенол хидроксилазната, докато при използване на хидрохинон или резорцинол е обратното. В клетки на шам *A. maritima* AL10 се

наблюдават значително по-високи стойности на фенол хидроксилазната активност при усвояването на фенол или катехол.

Най-висока фенол хидроксилазна активност (1.07 U/mg P) беше получена за клетки на щам *A. fumigatus* AL15, култивирани при субстрат фенол. Щамове *A. fumigatus* AL3 и *P. commune* AL5 също се отличиха с висока активност на този ензим при субстрат хидрохинон – съответно 0.247 U/mg P и 0.228 U/mg P, както и за *P. commune* AL5, култивиран при въглероден източник резорцинол (0.304 U/mg P). Най-висока стойност на активността на втория ензим от *o*-пътя на фенола беше получена отново за клетки на щам *A. fumigatus* AL15 (4.18 U/mg P), отгледани в култивационна среда с включен катехол. При щамове *A. glaucus* AL1 и *A. fumigatus* AL15 също се наблюдава висока катехол-1,2-диоксигеназната активност при усвояването на фенол, съответно 2.11 U/mg P и 1.44 U/mg P. Резултатите от тези експерименти са представени на Фиг. 9.

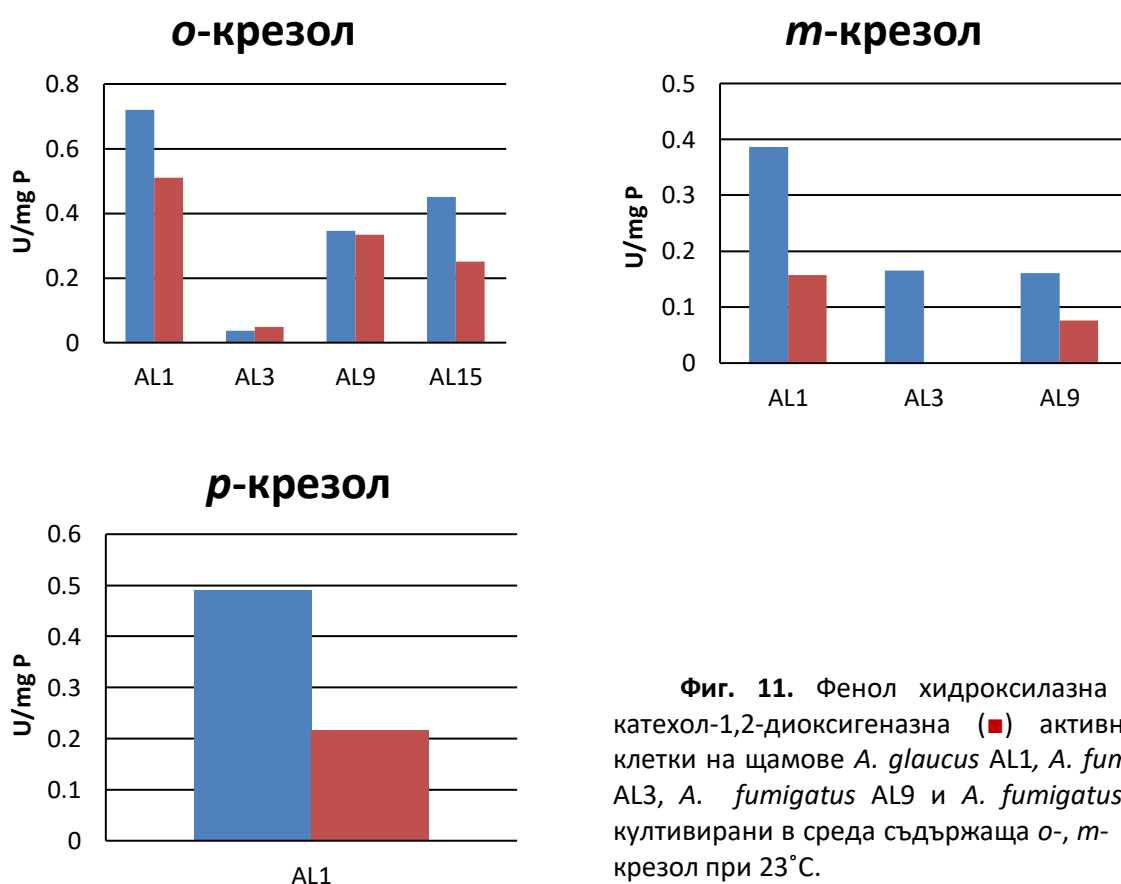


Фиг. 10. Фенол хидроксилазна (■) и катехол-1,2-диоксигеназна (■) активност в клетки на щамове *P. commune* AL5, *A. maritima* AL10 и *A. fumigatus* AL15, култивирани в среда съдържаща фенол, катехол, хидрохинон или резорцинол при 10°C.

Аналогичен експеримент за установяване на двете ензимни активности беше извършен и при 10°C, резултатите, от които са представени на Фиг. 10. Отново активността на катехол-1,2-диоксигеназата при култивиране на щамове в среда, съдържаща фенол или катехол беше значително по-висока, докато въглеродните източници хидрохинон и резорцинол доведоха до развитието на клетки, чиято фенол хидроксилазна активност беше по-висока от тази на другия ензим. Като цяло стойностите на двете активности бяха по-ниски при експеримента, проведен при 10°C. Изключение прави щам *P. commune* AL5, култивиран в среда, включваща хидрохинон,

където двете ензимни активности бяха по-високи при 10°C, сравнени с тези при 23°C. Щам *A. fumigatus* AL15 отново се отличи с най-висока стойност на катехол-1,2-диоксигеназата от експеримента със субстрати катехол и фенол (съответно 1.5 U/mg P и 1.008 U/mg P). Най-висока фенол хидроксилазна активност беше измерена в клетки на *P. commune* AL5, култивирани в среда, съдържаща хидрохинон и резорцинол (0.322 U/mg P и 0.233 U/mg P, съответно).

На Фиг. 11 са представени резултатите от ензимния анализ в клетки на изследваните щамове, култивирани в среда, включваща метилираните производни на фенола поотделно при 23°C. Като цяло, в тази група опити бе установена по-висока фенол хидроксилазната от катехол-1,2-диоксигеназна активност. Най-висока стойност за този ензим беше получена за щам *A. glaucus* AL1 при субстрати *o*-крезол - 0.72 U/mg P и *p*-крезол – 0.49 U/mg P. Най-висока стойност на активността на катехол-1,2-диоксигеназата (0.51 U/mg P) бе отчетена в клетки на същия щам при усвояване на *o*-крезол.



Фиг. 11. Фенол хидроксилазна (■) и катехол-1,2-диоксигеназна (■) активност в клетки на щамове *A. glaucus* AL1, *A. fumigatus* AL3, *A. fumigatus* AL9 и *A. fumigatus* AL15, култивирани в среда съдържаща *o*-, *m*- или *p*-крезол при 23°C.

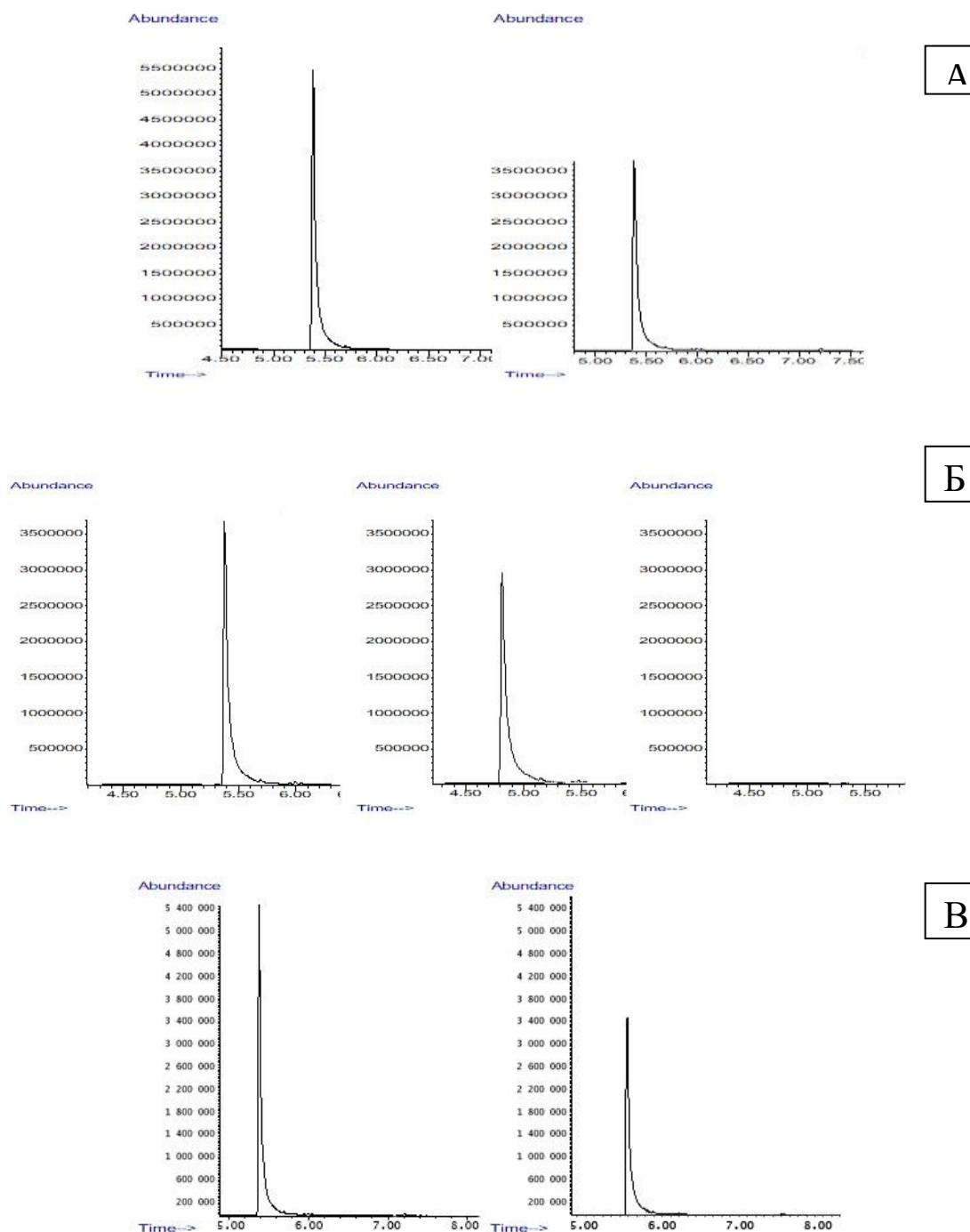
4.5. Деградация на ПАВ (нафтаден, антрацен и фенантрен) от антарктически щамове фунги

Бяха извършени газхроматографски-масспектрални анализи за установяване на разграждането на полиароматните въглеводороди (нафтаден, антрацен и фенантрен) пет щамови фунги: *A. glaucus* AL1, *A. fumigatus* AL3, *P. commune* AL5, *A. fumigatus* AL9 и *A. maritima* AL10 при 23°C и 10°C.

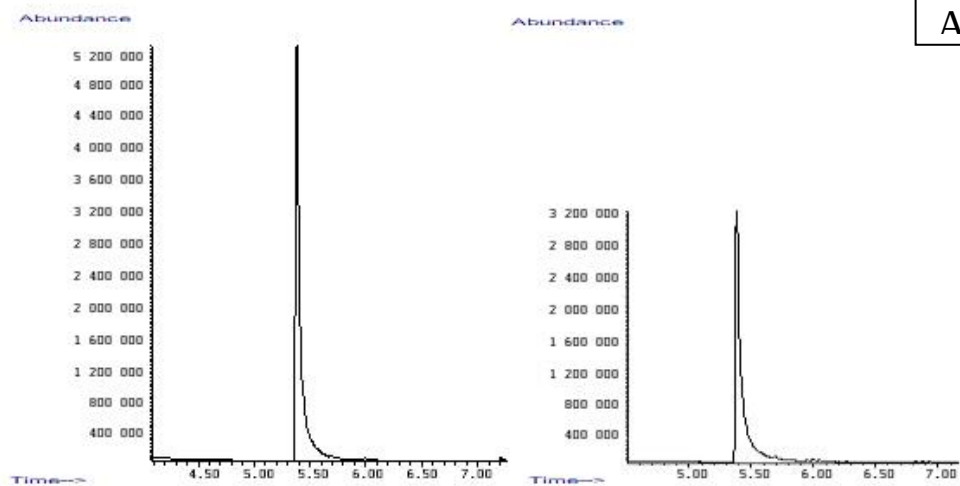
Резултатите от проведения GC-MS-анализ доказват, че след 5-дневно култивиране на щам *A. glaucus* AL1, при 23°C, в културална среда, където нафтаденът е единствен въглероден източник, с начална концентрация от 0.3017 g/l, концентрацията му пада до 0.2005 g/l (Фиг. 12A). След 5 дни култивиране се наблюдава подобно снижение и на съдържанието на антрацена от начална концентрация - 0.3212 g/l до 0.2404 g/l. Намаляването на концентрацията

на фенантрен при същите условия се осъществява по-бавно. При начална концентрация от 0.3113 g/l са необходими 9 дни култивиране за намаляването ѝ до 0.2006 g/l.

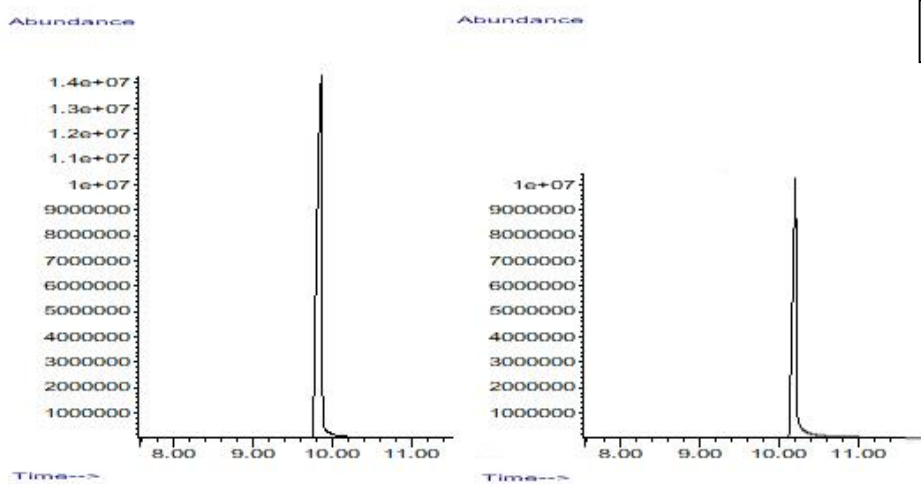
Данните от GC-MS-анализа на средата, съдържаща единствено нафтален като въглероден източник на култивиране за *A. fumigatus* AL3, при 23°C, показаха, че след 7 дена, началата концентрация от 0.3137g/l е намаляла до 0.1945 g/l, а на 15-тия ден – до 0.0534 g/l (Фиг. 12Б). При анализа на усвояването на антрацен, след 6 дена култивиране концентрацията му в средата намалява от 0.3140 g/l до 0.2380 g/l (фиг. 49 А, фиг. 49 Б), а в среда с фенантрен, концентрацията намалява от 0.3067 g/l до 0.0397 g/l.



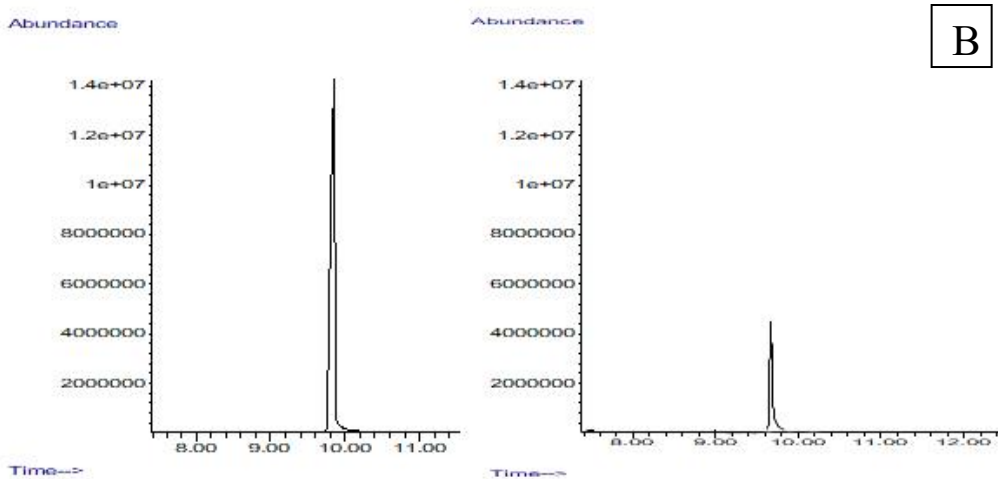
Фиг. 12 Газхроматографски – масспектрометричен анализ на концентрация на нафтален, измерена при началната точка и след 5, 15 или 9 дена съответно за щамове *A. glaucus* AL1 (А), *A. fumigatus* AL3 (Б) и *A. fumigatus* AL9 (В) при 23°C.



А

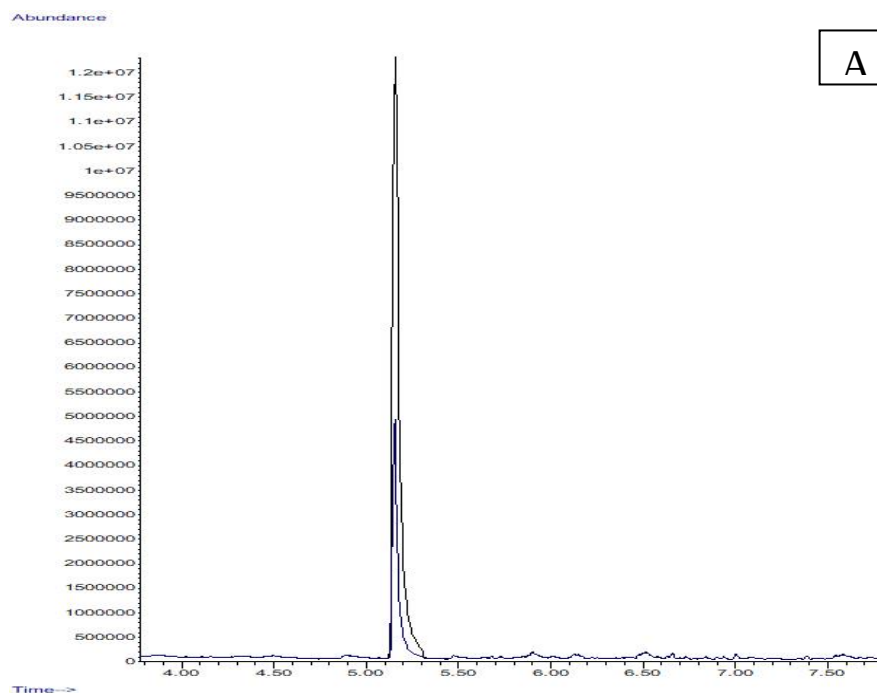


Б

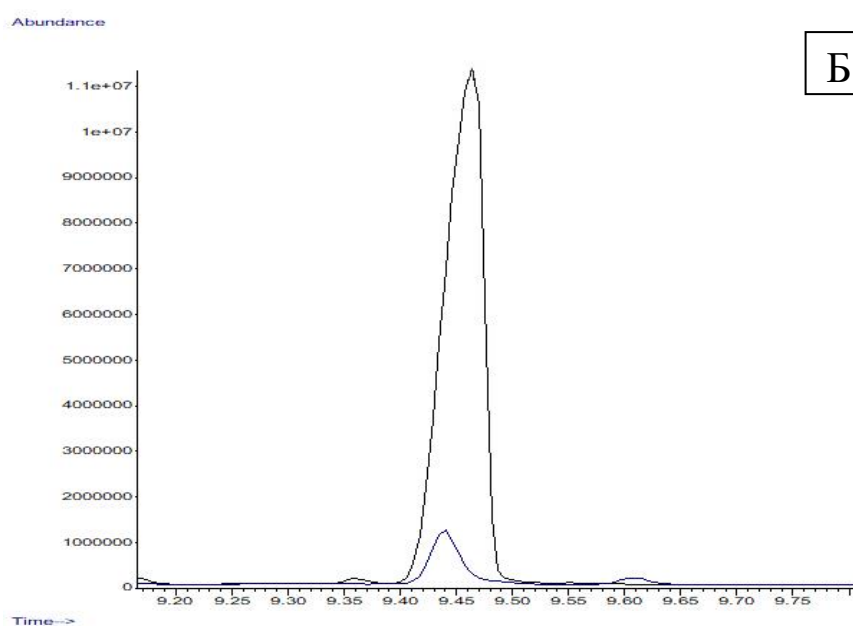


В

Фиг. 13. Газхроматографски – масспектрометричен анализ на концентрация на нафтален (А), антрацен (Б) и фенантрен (В), измерена на нулев и шести ден за щам *A. maritima* AL10, при 23°C.



А



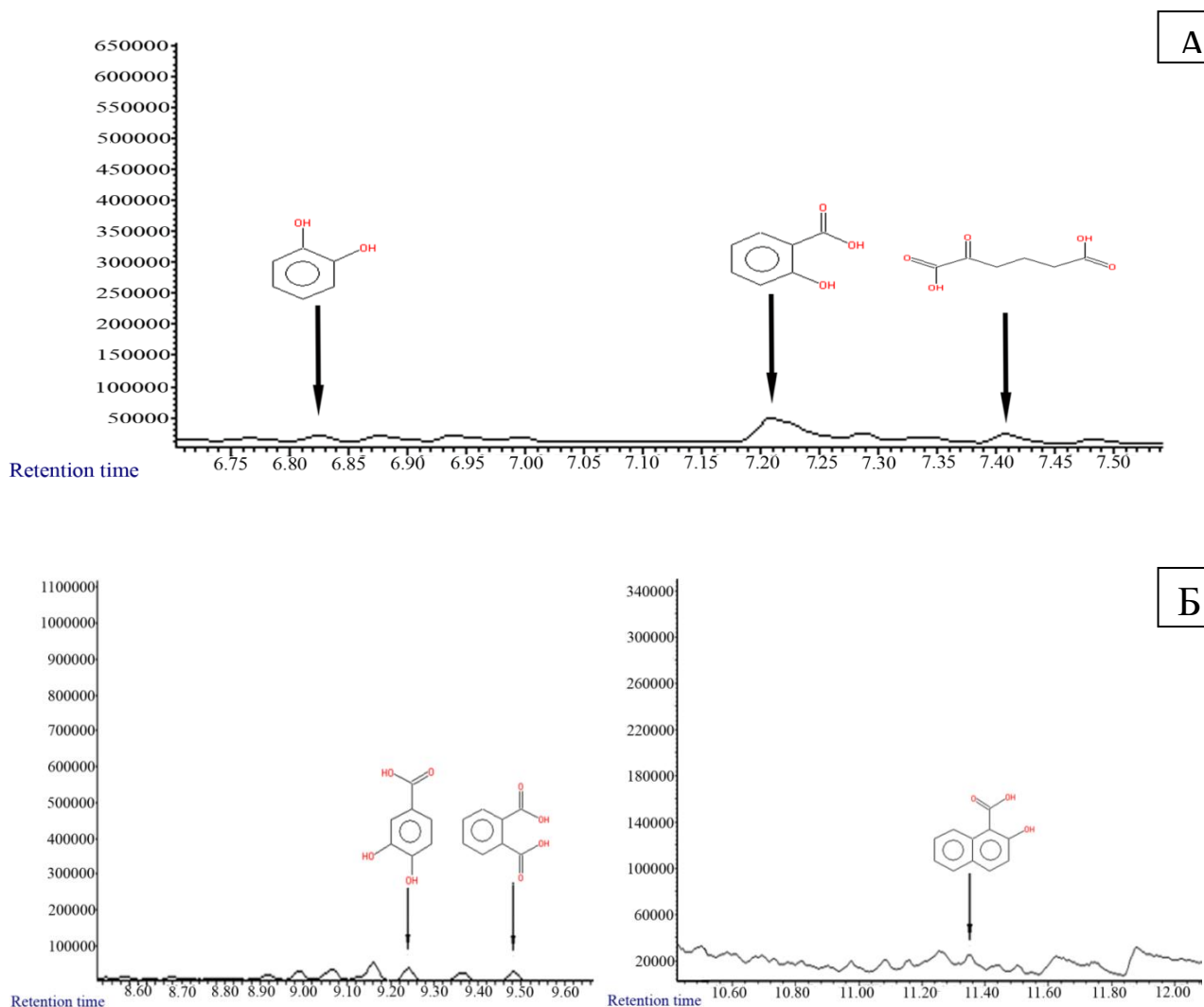
Б

Фиг. 14. Газхроматографски – масспектрометричен анализ на концентрация на нафтаген (А) и фенантрен (Б), измерена на нулев (—) и девети (—) ден за щам *A. maritima* AL10, при 10°C.

4.6. Междинни метаболити, открити при деградация на ПАВ

С цел откриване на междинни метаболити, които дават насока за възможните пътища на деградация при разграждането на нафтаген, антрацен и фенантрен в клетките на изследваните пет плесенни щамове, бяха проведени GC-MS-анализи на културални проби.

Илюстрация на тези изследвания са спектрите, получени при анализите с щам *A. glaucus* AL1, които са представени на на следващата фигура.



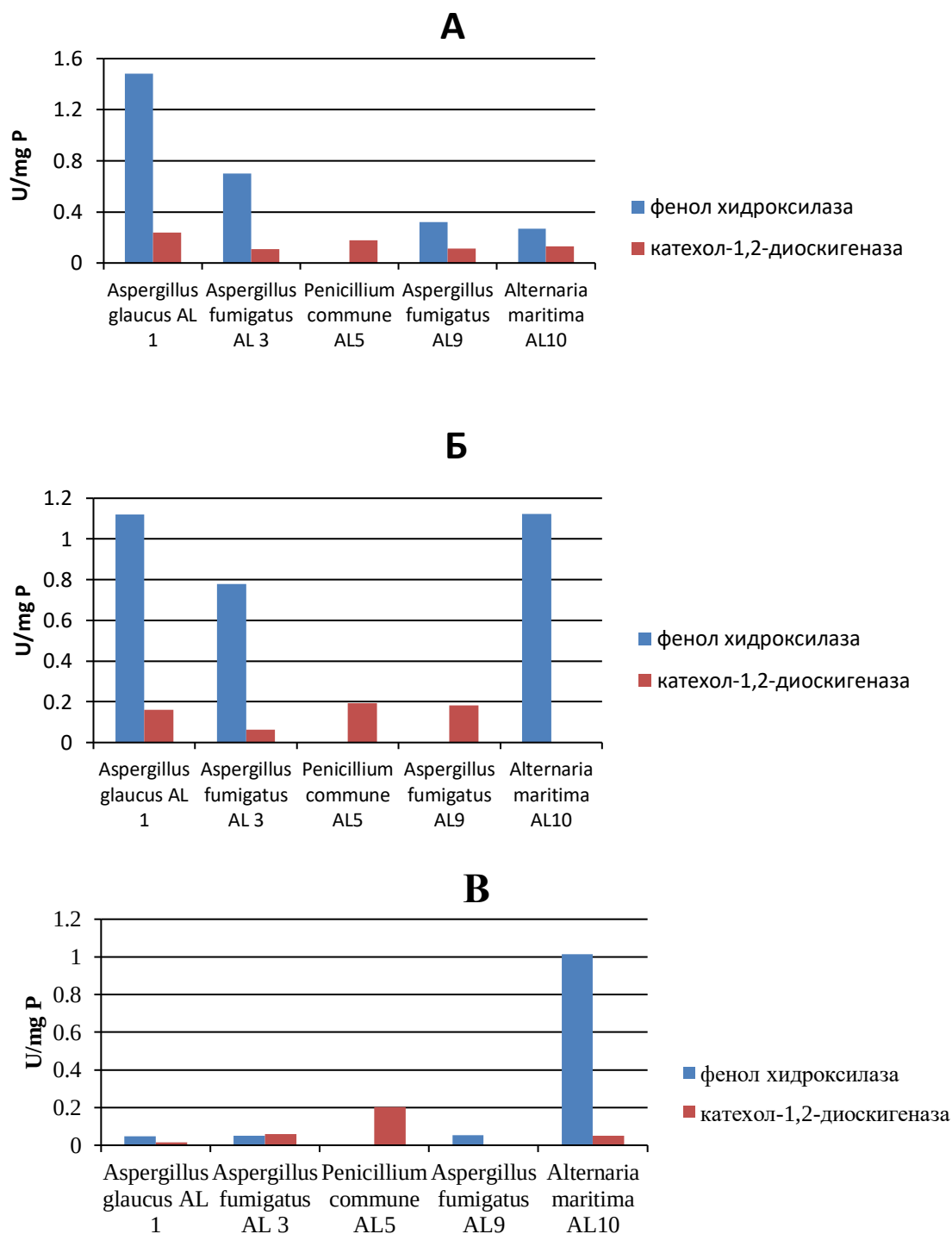
Фиг. 15. Газ-хроматографски анализ на междинни метаболити при деградацията на нафтален (А) - катехол, салицилова киселина, кетоадипинова киселина и при деградацията на антрацен - протокатехат, *o*-фталат и 2-хидрокс-1-нафтоена киселина от *A. glaucus* AL1.

Мас-спектрите на идентифицираните междинни метаболити, участващи в катаболитния път на нафталена и антрацена в клетките на *A. glaucus* AL1 са получени за проба от културалната среда на петия ден от култивирането. В следващите етапи на разграждане, поради бързия спад на тяхното количество, те са трудни за установяване. Присъствието на протокатехат и *o*-фталат в средата наподобява част от катаболитните пътища антрацена, предложени за аеробни бактерии. Наличието на 2-хидрокс-1-нафтоена киселина е изненадващ резултат. Присъствието на това съединение е подробно описано при някои фенантрен разграждащи бактерии, но все още не е намирано при разграждането на антрацен от гъби.

Като цяло резултатите, получени от биodeградационните експерименти и последващите ги хроматографски анализи в настоящото проучване водят до предположението, че най-вероятно съществуват сходни механизми на ПАВ-деградация при бактерии и някои нелигнинолитични fungi, независимо от различните конфигурации на генома и разнообразните пътища на регулация при отделните таксономични групи

4.7. Изследване на ключови ензимни активности в клетките на изследваните щамове при усвояване на нафтаген, антрацен и фенантрен, като въглеродни субстрати.

Резултатите от проведения експеримент за определяне на активността на двата ключови ензима за разграждането на ароматни съединения – фенол хидроксилаза и катехол-1,2-диоксигеназа в клетките на 5-те избрани щамове fungi, способни да разграждат нафтаген, антрацен или фенантрен, като единствени въглеродни източници при 23°C са представени на Фиг. 16.



Фиг. 16. Фенол хидроксилазна и катехол-1,2-диоксигеназна активности в клетки на щамове *A. glaucus* AL1, *A. fumigatus* AL3, *P. commune* AL5, *A. fumigatus* AL9 и *A. maritima* AL10, култивирани в среда, съдържаща нафтаген (А), антрацен (Б) или фенантрен (В) при 23°C.

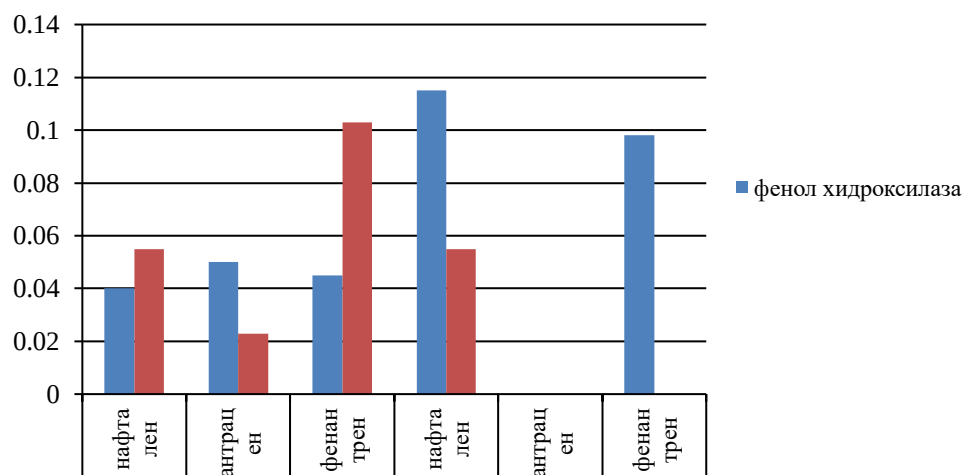
При експериментите с нафтаден, прави впечатление високата фенол хидроксилазна активност за клетки на щам *A. fumigatus* AL1 - 1.48 U/mg P и за тези на щам *A. fumigatus* AL3 – 0.700 U/mg P. Стойностите за активността на двата ензима, измерени за клетките на щамове *A. fumigatus* AL9 и *A. maritima* AL10 бяха доста близки помежду си. Фенол хидроксилазна активност не беше измерена в клетки на щам *P. commune* AL5(16A). Най-висока катехол-1,2-диоксигеназна активност беше измерена в клетки на щам *A. fumigatus* AL1 – 0.240 U/mg P.

Данните от експериментите с антрацен показаха, че фенол хидроксилазната активност в клетки на щамове *A. glaucus* AL1, *A. fumigatus* AL3 и *A. maritima* AL10 е висока – съответно 1.12 U/mg P, 0.78 U/mg P и 1.123 U/mg P, докато при щамове *P. commune* AL5 и *A. fumigatus* AL9 такава активност не беше регистрирана. Стойностите за катехол-1,2-диоксигеназната активност са доста по-ниски от тези, отчетени при разграждането на (Фиг. 16Б). Най-висока катехол-1,2-диоксигеназна активност е отчетена в клетки на щам *P. commune* AL5 – 0.193 U/mg P. Катехол-1,2-диоксигеназна активност не беше измерена в клетки на щам *A. fumigatus* AL9.

Резултатите от изследванията с фенантрен са илюстрирани на Фиг. 16В. Най-висока фенол хидроксилазна активност (1.013 U/mg P) беше отчетена за щам *A. maritima* AL10, подобно на резултатите за стойностите на този ензим, получени от аналогичния експеримент в среда, съдържаща антрацен. При останалите изпитвани щамове, измерената фенол хидроксилазна активност беше ниска. Най-висока катехол-1,2-диоксигеназна активност (0.204 U/mg P) беше установена в клетки на щам *P. commune* AL5. При този щам не беше измерена фенол хидроксилазна активност в експериментите с култивиране на мицел в среда с PAHs, включени като единствени източници на въглерод. В клетки на щам *A. fumigatus* AL9 не беше регистрирана катехол-1,2-диоксигеназна активност.

Два щама фунги, *P. commune* AL5 и *A. maritima* AL10 бяха култивирани в минерална среда, съдържаща нафтаден, антрацен или фенантрен като единствен източник на въглерод, при 10°C, с цел да се определят активностите на ензимите фенол хидроксилаза и катехол-1,2-диоксигеназа. Получените резултати са представени на Фиг. 17.

Най-висока фенол хидроксилазна активност в клетки на щам *P. commune* AL5 беше установена при разграждането на антрацен, а най-високата катехол-1,2-диоксигеназна активност - при усвояването на фенантрен (0.103 U/mg P). Най-високите фенол хидроксилазни активности в опитите на 10°C бяха измерени за клетки на щам *A. maritima* AL10, култивирани в среда, включваща нафтаден и фенантрен – съответно 0.115 U/mg P и 0.098 U/mg P, като не беше отчетена катехол-1,2-диоксигеназна активност при култивирането му в среда, съдържаща фенантрен.



Фиг. 17. Фенол хидроксилазна и катехол-1,2-диоксигеназна активности в клетки на щамове *P. commune* AL5 и *A. maritima* AL10, култивирани в среда, съдържаща нафтаден, антрацен или фенантрен при 10°C.

4.8. PCR - амплификация и ДНК - секвениране на гени, кодиращи ензима фенол хидроксилаза и катехол 1,2-диоксигеназа в изследваните щамове микроорганизми

На основата на ДНК секвенс на гени, в клетки на щам *A. fumigatus* Af293, които кодират ензими с фенол хидроксилазна активност (NCBI XM_743491.1) и катехол диоксигеназна активност (NCBI XM_744333) активност, са създадени двойки олигонуклеотидни праймери. Получените PCR-продукти от амплификацията, проведена с геномна ДНК на щамове *A. glaucus* AL1, *A. fumigatus* AL3, *A. fumigatus* AL9 и *A. fumigatus* AL15 бяха анализирани електрофоретично и след това подложени на секвенционен анализ.

На фиг. 18 и фиг. 19 са демонстрирани нуклеотидната (728 bp без интроните) и съответната ѝ аминокиселинна секвенция (239 аминокиселини) на гена, кодиращ ензима фенол хидроксилаза на *A. glaucus* AL1.

```
GCGACTGGTGGACAATCTACCGGGTGGGTAGGAGAGTTGCCAACCATTTACCTACAAGCAGCGCGTCTTCTCGGTGG
GGACGCTGTACACACACATAACCCCAAGGGGGGTGAGGGGATGAATGTCTCCATGCAGGATGCATACAACCTGGGATG
GAAGCTGGGTGGTGTACTGCGTGGCCAACCTGCGTCCGTCCGTAAGTGGCGACGTACGAATCCGAACGTCGACCCGTGGCC
CAGGACCTGATCAAGCTAGATACGAGTATGGGCCGCGTGTGGCGGGCGAGACCATGTCCGAGACTCCCGAGGTGCTT
CAGGTTTATGAGCAGCTGCGCAACTACGGCAGCGGCGCCAACATCTGCTACTCGCCAAACATCCTTGTGGCGAGTCCCC
AGCAGTCCCAGCAACACCTGGCCGCGCATCTGAGGCTGGGAATGCGGTTCCCCAGCCATCCGGTGGTCAACCTTGCCAG
CGCGATCACCATGGAGAGCCAGAGTCTACTGCCGAGTAATGGCTCGTGGCGGCTCTGGGTCTTTGCCGGCAATGTTGTC
GCTTGTCCAGCGCAGTTGAAGCGGGTGAACAGCCTCGGGGAGAAGCTGTGCGCTCTGACAGCCCGTCTTGCTGCGCTCC
AGATGCTCTCCACGCCGTTTCTCGAGATACTGCTCCTCTACAAAGGTCGAGTGGAGGAGATGGAAGTCAGTGATTCCAT
CCCATCTTCACGCGCTGA
```

```
DWWTIYRVGRRVANHTYKQRVFLGGDAVHTHTPKGGQGMNVSMQDAYNLGWKLGGVLRGQLRPSVLATYESERRPV
AQDLIKLDTSMGRVLAGEITMSETEVQLVYEQRLNRYSGANICYSPNIVASPPQSQHLAAHLRLGMRFPSPVNVNLASAI
TMESQSLPNSGWSRLWVFAGNVVACPAQLKRVNSLGEKLCALTARLAALQMLSTPFLEILLYKGRVEEMEVSDFHPIFTR
```

Фиг. 18. Частична ДНК секвенция на гена, кодиращ ензима фенол хидроксилаза на *A. glaucus* AL1 (NCBI Acc. N AIY27717.1) и съответната ѝ аминокиселинна секвенция (NCBI Acc. N AIY27717.1).

```
TTGTCTGTGACGTGATCGGGCTCGAGTCGCTTGTGACGAAATCACCTTCAAGCTTGCTGATGAGGCCGCCGACGCACCC
ACCGCGACCGCCATCCTCGGCCCTTCTTCCGCGCTGATACCCCTACCGCAACAACGGCGACAATATCGTCAAGGACGT
GCCCGACGGCGAGATGGTGTTCATGCACGGCCGGGTGATCGATTCCAGACCAAGAAGCCGCTCGTTGGAGCGACGGT
GGAGGTGTGGCAGGCGTCCACGAACGGGCTGTATGAGCAGCAGGATCCGAACAGGAGGAGTTAACTTGCGGGGGA
AGTTCAAGACGGATGCTGACGGGCGGTACTACTTTTACTGCTGCGTCCGACGCCGTATCCTGTTCCGAATGATGGTGGT
CCCGCCGGGAAGTTACTCGAGCTCATGGACCGACACCCCTTCCGCCCTGCCCATATCCACATCATTGGCTACGCACGATG
GCCACAAGCCCTCACCACGCAGATCTTCGACCGCCAGGACAAGTACCTAACAAACGACTCAGTATTTGCCGTCAAGGA
CTCGCTGATCGTGACTTTGTGCCGCGCAAGGATGACCCGCGAGGCTGGACTTGAGCTTGAATACGACGTCAAGCTGGT
GCGGACCAGGCGTAG
```

```
VCDVIGLESVLDEITFKLADEAADAPTATAILGPFFRADTPYRNNGDNIVKDVPDGMVMFMHGRVIDFQTKKPLVGATVEV
WQASTNGLYEQQDPNQEEFNLRGKFKTDADGRYYFYCLRPTYPVPNDGGPAGKLELMDRHPFRPAHIIHIGYARWPQA
PHHADLRPPGQVPNKRLSICRQGLADRGGLCAAQG.PAGWT.A.IRRQAGGGPGV
```

Фиг. 19 Частична ДНК секвенция на гена, кодиращ ензима катехол-1,2- диоксигеназа на *A. glaucus* AL1 (NCBI Acc. N AIY27718.1) и съответната ѝ аминокиселинна секвенция (NCBI Acc. N AIY27718.1).

На следващите две фигури, фиг. 20 и фиг. 21, са показани съответните фенол хидроксилазна и катехол диоксигеназна ДНК и протеинова секвенции, идентифицирани в генома на щам *A. fumigatus* AL15. Получена е частична секвенция за фенол хидроксилазен ген с дължина от 728 bp., а съответстващата и аминокиселинна последователност е с дължина 241 АА. Генът, кодиращ полипептидната верига на ензима катехол-1,2-диоксигеназа на щам *A.*

fumigatus AL15 е съставен от 1063 bp и е организиран в 4 екзона и три интрона с дължина 74 bp, 68 bp и 54 bp. Съответстващата му аминокиселинна секвенция е с дължина от 288 аминокиселини.

Проведени са аналогични експерименти за идентификация и секвениране на гени, кодиращи ензима фенол хидроксилаза и катехол 1,2-диоксигеназа в PCR - амплификация и ДНК - секвениране на *A. fumigatus* AL3 (NCBI Acc. N KT781126; Acc. N AMM02733.1; Acc. N KT781126; Acc. N AMM02734.1), и *A. fumigatus* AL9 (NCBI Acc. N JQ639074.1; Acc. N AFJ97046.1; Acc. N MK598849).

```
GCGACTGGTGGACAATCTACCGGGTGGGTAGGAGAGTTGCCAACCATTTACCTACAAGCAGCGCTCTTCC
TCGGTGGGGACGCTGTACACACACATACCCCAAGGGGGGTCAGGGGATGAATGTCTCCATGCAGGATGCA
TACAACCTGGGATGGAAGCTGGGTGGTGTACTGCGTGGCCAACTGCGTCCGTCCGTACTGGCGACGTACGAA
TCCGAACGTCGACCCGTGGCCAGGACCTGATCAAGCTAGATACGAGTATGGGCCGCGTGTCTGGCGGGCGA
GACCATGTCCGAGACTCCCGAGGTGCTTCAGGTTTATGAGCAGCTGCGCAACTACGGCAGCGGCGCCAACAT
CTGCTACTCGCCAAACATCCTTGTGGCGAGTCCCCAGCAGTCCCAGCAACACCTGGCCGCGCATCTGAGGCTG
GGAATGCGGTTCCCGAGCCATCCGGTGGTCAACCTTGCCAGCGCGATCACCATGGAGAGCCAGAGTCTACTG
CCGAGTAATGGCTCGTGGCGGCTCTGGGTCTTTGCCGGCAATGTTGTGCTTGTCCAGCGCAGTTGAAGCGG
GTGAACAGCCTCGGGGAGAAGCTGTGCGCTCTGACAGCCCGTCTTGCTGCGTCCAGATGCTCTCCACGCCGT
TTCTCGAGATACTGCTCCTCTACAAAGGTCGAGTGGAGGAGATGGAAGTCAGTGATTTCCATCCCATCTTAC
GCGCTGA
```

```
DWWTIYRVGRRVANHFYKQRVFLGGDAVHTHTPKGGQGMNVSMQDAYNLGWKLGVLRGQLRPSVLATY
ESERRPVAQDLIKLDTSMGRVLAGETMSETPEVLQVYEQLRNYGSGANICYSNVLVASPQQSQQHAAHLRLG
MRFPSPVNVNLAITMESQSLPSNGSWRLWVFAGNVVACPAQLKRVNSLGEKLCALTARLAALQMLSTPFLE
ILLYKGRVEEMEVSDFHPIFTR
```

Фиг. 20. Частична ДНК секвенция на гена, кодиращ ензима фенол хидроксилаза на *A. fumigatus* AL15 (NCBI Acc. N KT371934.1) и съответната ѝ аминокиселинна секвенция (NCBI Acc. N AMA07787.1).

```
ATGGCTACTCATCGATTTGACCCCACTTTACCGATAATGTCATCAACGCGATGGGTCCCAAGACCAATCCGC
GCTTCCGGAAGGTGATGGCCAGCCTAATCCGCCATGTGCATGACTTTGCGCGCGAGAACGAACCTTACCGTCG
ACGAGTGGATGGCCGCGCTCAAGCTGCTTAAGTGGGCCGCGCAGATGAGCGATGACAAGCGCAACGAAGG
TCAACTTGTCTGTGACGTGATCGGGCTCGAGTCGTATGTGTTACATCCACCAAACCTCACAGTCCCAGACATCA
AGTACTAACCGCCTCGCTTGTGTGCGTGTCCAGGCTTGTGACGAAATCACCTTCAAGCTTGTGATGAGGC
CGCCGACGCACCCACCGCGACCGCCATCCTCGGCCCTTCTTCCGCGCTGATACCCCTACCGCAACAACGGC
GACAATATCGTCAAGGACGTGCCGACGGCGAGATGGTGTTCATGCACGGCCGGGTGATCGATTTCCAGAC
CAAGAAGCCGCTCGTTGGAGCGACGGTGGAGGTGTGGCAGGCGTCCACGAACGGGCTGTATGAGCAGCAG
GATCCGAACCAGGAGGAGTTTAACTTGCGGGGGAAGTTCAAGACGGATGCTGACGGGCGGTACTACTTTTA
CTGCCTGCGCCCGACGCCGTATCCTGTTCCGAATGATGGTGCCTATTCTGATGCTTCATCGCCTATCGCATTGG
AGACTTTGCAAACGCTAATCTTGAACGACGTACAGGTCCCGCCGGGAAGTTACTCGAGCTCATGGACCGACA
CCCCTTCCGCCCTGCCCATATCCACATCATTGTGAGTATACGCTGCTGTTGAGTGAAGAGTCAGCCTGGGCTA
ACTGCACTGCAGGCTACGCACGATGGCCACAAGCCCCTCACCACGCAGATCTTCGACCGCCAGGACAAGTAC
CTAACAAACGACTCAGTATTTGCCGTCAAGGACTCGCTGATCGTGGACTTTGTGCCGCGCAAGGATGACCCG
CAGGCTGGACTTGAGCTTGAATACGACGTCAAGCTGGTGGCGGACCAGGCGTAG
```

```
MATHRFDPNFTDNVINAMGPKTNPRFRKVMASLIRHVHDFARENELTVDEWMAGVKLLNWAGQMSDDKR
NEGQLVCDVIGLESIVDEITFKLADEAADAPTATAILGPFFRADTPYRNNGDNIVKDVPDGMVFMHGRVIDFQ
TKKPLVGATVEVWQASTNGLYEQQDPNQEEFNLRGKFKTDADGRYYFYCLRPTYPVPNDGGPAGKLELMDR
HPFRPAHIHIIATHDGHKPLTTQIFDRQDKYLTNDSVFAVKDSLIVDFVPRKDDPQAGLELEYDVKLVDQA.
```

Фиг. 21. ДНК секвенция на гена, кодиращ ензима катехол-1,2-диоксигеназа на *A. fumigatus* AL15 (NCBI Acc. N KT371935.1) и съответната ѝ аминокиселинна секвенция (NCBI Acc. N AMA07788.1).

5. ОБСЪЖДАНЕ

Обектите на нашите изследвания *Aspergillus glaucus* AL1, *Aspergillus fumigatus* AL3, *Penicillium commune* AL5, *Aspergillus fumigatus* AL9, *Alternaria maritima* AL10 и *Aspergillus fumigatus* AL15 са оригинални плесенни щамове, изолирани от почвени проби, взети от о-в Ливингстон, Антарктика.

Шестте изследвани щамове показват възможност да растат и деградираат фенол и някои фенолни деривати, при култивиране както в богата органична така и в минерална хранителни среди. При предшествашки изследвания е установено, че и при шестте избрани щамове не се открива наличие на лаказна активност, което показва, че наблюдаваната деградацията се дължи изключително на действието на вътреклетъчните ензими, участващи в β -кетoadипатния път за катаболизъм на фенола.

5.1. Деградация на фенол и монофенолни съединения от антарктически щамове фунги

Плесени от р *Aspergillus* многократно са докладвани като биодеграданти на замърсители с ароматен характер. Най-често се съобщава за щамове от вида *Aspergillus niger*, способни да разграждат фенол и фенолни деривати.

Представителите на *A. fumigatus* са предмет на засилващ се интерес като перспективни микробни деградатори на разнообразни химични замърсители на околната среда. Докладвано е, че има представители на този вид, способни да разграждат различни фенолни съединения.

Представителите на *A. fumigatus*, използвани в настоящото изследване се отличават със способността си да усвояват широк спектър ароматни субстрати, а щам *A. fumigatus* AL15, който разгражда 0.3 g/l фенол, катехол и о-крезол съответно за 45 ч, 24 ч и 25 ч е способен да разгради напълно същите концентрации фенол и катехол при 10°C.

До настоящия момент, няма доклади за представители на вида *Aspergillus glaucus* способни да разграждат ароматни съединения. Щам *Aspergillus glaucus* AL1, който е обект на изследване в настоящата дисертация е способен да разгради напълно фенол, катехол, хидрохинон, о-, m- и p-крезол при 23°C.

В последните години нарастват проучванията върху способността на щамове *P. commune* да участват в разграждането на нефт и нефтени деривати. В достъпната ни литература, обаче не се откриват проучвания, свързани с разграждането на конкретни ароматни субстрати.

Използваният в настоящето проучване щам *Penicillium commune* AL5 проявява много добри деградационни способности по отношение на катехол и резорцинол. Тази плесен разгражда напълно и 0.3 g/l фенол и хидрохинон за 188 ч.

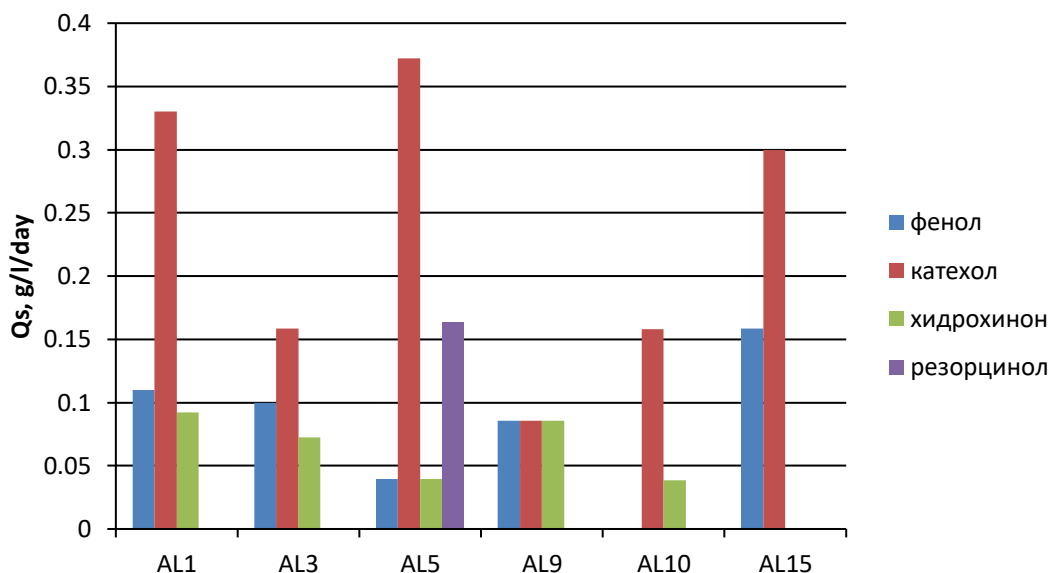
До настоящия момент, данни по отношение на деградацията на ароматни съединения, осъществявани от представители на р. *Alternaria* са много оскъдни, а щамове на *Alternaria maritima* не са проучвани по отношение на способността им да разграждат ароматни съединения. Щам *Alternaria maritima* AL10, селектиран и изследван в дисертацията се изяви като добър деградационен агент на катехол и хидрохинон, разградени напълно съответно за 44 ч и 188 ч при мезофилни условия.

В този контекст, може определено да се каже, че получените в тази разработка резултати от експерименти с щамове *A. glaucus* AL1, *P. commune* AL5 и *A. maritima* AL10 носят не само оригинален, но и иновативен характер.

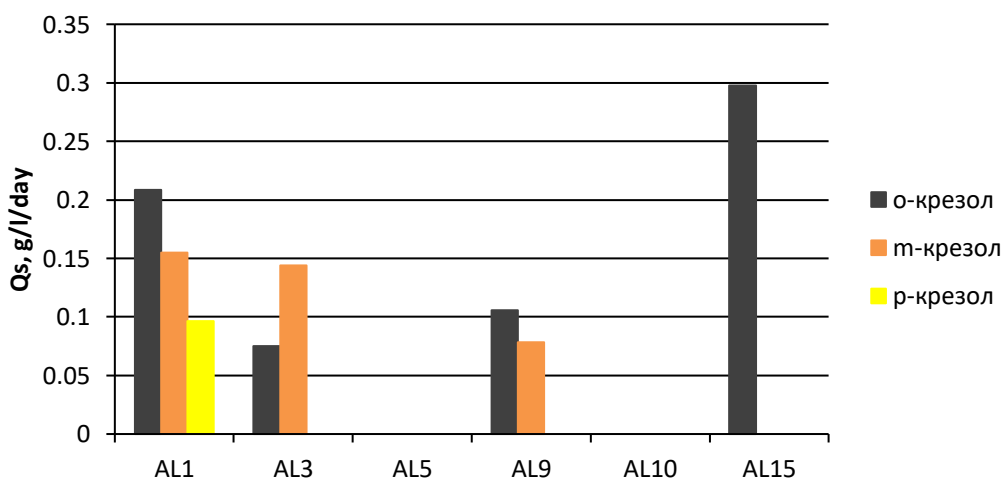
На фиг. 22 са демонстрирани в сравнителен план скоростите на разграждане на хидроксиланите монофеноли от изследваните щамове. Скоростта за разграждане е изчислена по формула, където: $Q_s(\text{final})$ – скорост на разграждане, g/l/day; $S(0)$ – начална концентрация на субстрата, g/l; $S(\text{final})$ – крайна концентрация на субстрата, g/l.

$$Q_s(\text{ final}) = \frac{S(0) - S(\text{ final})}{\text{days}}$$

От показаните данни се вижда, че фенолът се разгражда най-бързо от щам *A. fumigatus* AL15 (45 ч). Катехолът се усвоява от всички щамове, но най-бърза деградация се осъществява от щам *P. commune* AL5 - 20 часа. Хидрохинонът се разгражда сравнително по-бавно при всички щамове, което свидетелства за по-голямата чувствителност на изследваните плесени към този субстрат. Най-токсичен се оказва резорцинолът, който при температура 23°C се разгражда и усвоява само от *P. commune* AL5.



Фиг. 22. Сравнение на скоростта на пълно разграждане на фенол и хидроксилирани фенолни деривати при *A. glaucus* AL1, *A. fumigatus* AL3, *P. commune* AL5, *A. fumigatus* AL9, *A. maritima* AL10 и *A. fumigatus* AL15, култивирани в минерална среда Czapek-Dox, съдържаща 0.3 g/l фенол, катехол, хидрохинон или резорцинол, като единствени въглеродни източници на 23°C.

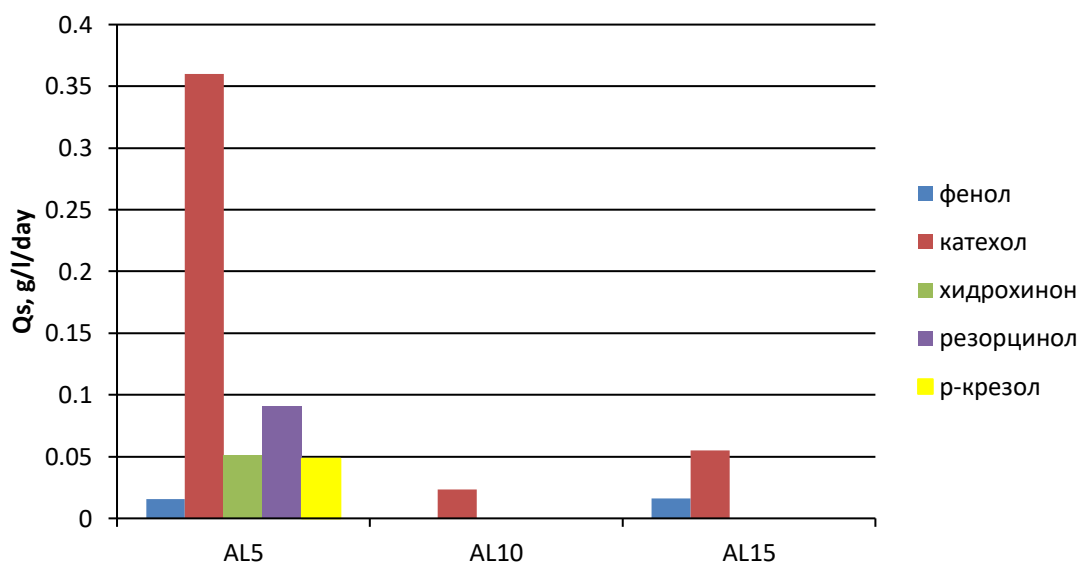


Фиг. 23. Сравнение на скоростта на пълно разграждане на метилирани фенолни деривати при *A. glaucus* AL1, *A. fumigatus* AL3, *P. commune* AL5, *A. fumigatus* AL9, *A. maritima* AL10 и *A. fumigatus* AL15, култивирани в минерална среда Czapek-Dox, съдържаща 0.3 g/l о-, м-, или р-крезол, като единствени въглеродни източници на 23°C.

По високият токсичен ефект на метилираните производни на фенола се изразява в относително по-бавното им усвояване в сравнение с хидроксилните производни (Фиг. 23). Най-висока скорост при разграждането на о-крезол, едно от най-трудно биоразградимите ароматни

съединения се отчита за щам *A. fumigatus* AL15, който елиминира напълно 0.3 g/l о-крезол за 25 часа. Изследваните щамове проявяват най-слаба деградационна активност към *p*-крезола, който се разгражда напълно само от щам *A. fumigatus* AL1. Тази плесен разгражда напълно и *m*-крезол за най-кратко време – 48 часа.

Все по-нарастващ е интересът към микроорганизми, способни да растат и да усвояват съединения с ароматен характер при ниски температури. Все още подобни данни за еукариотни микроорганизми са много малко. В нашата разработка са представени и данни за скоростта на разграждане на фенол, хидроксилирани и метилирани монофеноли от три щамове, способни да осъществяват деградация на монофеноли при 10°C (Фиг. 83).



Фиг. 24. Сравнение на скоростта на пълно разграждане на фенол, хидроксилирани фенолни деривати и *p*-крезол при *P. commune* AL5, *A. maritima* AL10 и *A. fumigatus* AL15, култивирани в минерална среда Czarek-Dox, съдържаща 0.3 g/l фенол, катехол, хидрохинон, резорцинол или *p*-крезол като единствени въглеродни източници на 10°C.

Подобно на данните от експериментите, проведени при 23°C, катехолът е най-лесно усвоимият субстрат. Най-висока скоростта на разграждане и съответно деградационната активност по отношение на катехол показва щам *P. commune* AL5. Щамът елиминира наличния катехол за 20 часа и при 23°C, и при 10°C, което показва, че усвояването на този субстрат не се влияе от температурата и протича с еднакво висока скорост, докато разграждането на фенол, хидрохинон и резорцинол е значително по-бавно, когато щамът се култивира при 10°C. Друг изключително важен факт, установен в хода на експериментите е, че *P. commune* AL5 разгражда напълно *p*-крезол при 10°C, докато при 23°C деградацията на този субстрат е само частична. Това свидетелства за афинитета на този щам към ниски температури и потвърждава психротрофния му характер и го прави евентуален успешен участник в биоремедиация на индустриално замърсени води и почви, в райони, за които е характерна голяма температурна разлика през различните сезони.

Другите два психротрофни щамове, *A. maritima* AL10 и *A. fumigatus* AL15 се влияят значително повече от едновременното въздействие на двата стресови фактора – ниска температура и токсични съединения. *A. maritima* AL10 разгражда напълно единствено катехол за 340 часа, а щам *A. fumigatus* AL15 разгражда фенол и катехол, съответно за 450 и 144 часа, което показва значително по-ниска скорост от тази при същите процеси при 23°C.

В заключение може да се каже, че наред с щам *A. fumigatus* AL15 и другите щамове показват висок биотехнологичен потенциал. Възможностите на мезофилните щамове *A. glaucus* AL1, *A. fumigatus* AL3 и *A. fumigatus* AL9 да разграждат напълно широк кръг от монофенолни

съединения, също ги прави евентуални успешни участници при технологии за пречистване на индустриално замърсени води и почви, отличаващи се с различен състав или съдържащи смес от подобни съединения. Щам *A. fumigatus* AL15 може да деградира и усвоява напълно 0.3 g/l фенол, катехол и *o*-крезол като единствени въглеродни източници и има предимството да се адаптира и развива при ниска температура, което има голямо значение за приложението му при третиране на замърсени води в открити басейни.

5.2. Ключови ензимни активности в клетките на изследваните щамове при усвояване на монофенолни субстрати

Способността на микроорганизмите да разграждат даден субстрат зависи най-вече от наличието на ензими, катализиращи неговата деградация. Първите два ензима от *o*-пътя на разграждане на фенол – фенол хидроксилаза и катехол-1,2-диоксигеназа имат решаваща роля в микробния катаболичен път на фенола и неговите производни. При предшествващи изследвания бе доказано, че деградацията на ароматните съединения от шестте изследвани щамове се дължи изключително на действието на вътреклетъчните ензими, участващи в β -кетoadипатния път за катаболизъм на фенола. На Табл. 3 илюстрирани получените данни за фенол хидроксилазните и катехол-1,2-диоксигеназните активности при разграждане на монофенолни субстрати от мезофилните щамове *A. glaucus* AL1, *A. fumigatus* AL3 и *A. fumigatus* AL9. Част от тях са определени при предходни изследвания [Gerginova et al., 2013].

Таблица 3. Сравнение между стойностите на фенол хидроксилазата и катехол-1,2-диоксигеназата при *A. glaucus* AL1, *A. fumigatus* AL3 и *A. fumigatus* AL9 при усвояване на хидроксилирани или метилирани монофеноли, като единствени въглеродни източници в култивационна среда Czapek-Dox, съдържаща 0.3 g/l въглероден субстрат, при 23°C.

Щам	Ензимна активност (U/mg P)							
	Ензим	Фенол	Катехол	Хидрохинон	Резорцин	<i>o</i> -крезол	<i>m</i> -крезол	<i>p</i> -крезол
AL1	Фенол хидроксилаза	0.254	0.179	0.125	-	0.720	0.386	0.490
	Катехол -1,2-диоксигеназа	2.11	1.39	0.096	-	0.51	0.157	0.216
AL3	Фенол хидроксилаза	0.093	0.03	0.247	-	0.036	0.165	-
	Катехол -1,2-диоксигеназа	0.189	0.276	0.131	-	0.048	0	-
AL9	Фенол хидроксилаза	0.098	0.026	0.044	-	0.345	0.161	-
	Катехол -1,2-диоксигеназа	0.432	0.427	0.006	-	0.334	0.076	-

Най-висока катехол-1,2-диоксигеназна активност беше измерена в клетки на щам *A. glaucus* AL1, култивиран в среда, съдържаща фенол и катехол, което се съчетава и с резултатите, демонстриращи деградационния потенциал на щамове. При другите два щамове беше установено, че катехол-1,2-диоксигеназният ензим предпочита фенола и катехола, като субстрати. Фенол хидроксилазната активност в повечето случаи е значително по-ниска, което означава, че този ензим определя скоростта на разграждане на изследваните субстрати.

При разграждането на метилирани производни на фенола от трите посочени плесени беше установена обратната зависимост – фенол-хидроксилазните активности, бяха с по-високи стойности. Така например най-високата фенол хидроксилазна активност (0.720 U/mg P), измерена в експериментите, свързани с усвояване на монофеноли беше в клетки на щам *A. glaucus* AL1, култивирани в среда с *o*-крезол. Висока стойност на този ензим (0.345 U/mg P) беше отчетена и в клетки на щам *A. fumigatus* AL9. В резултат а това, *o*-крезолът е най-бързо разграждащото се метилирано производно на фенола от тези плесени.

Получените данни за ензимни активности на щамове *P. commune* AL5, *A. maritima* AL10 и *A. fumigatus* AL15, способни да разграждат фенол и негови хидроксилирани производни, като единствен въглероден източник, както при 23°C, така и при 10°C са обобщени в табл. 4. При тези експерименти също се установява синхрон между високите нива на катехол-1,2-диоксигеназната активност и скоростта на деградация. Така например, беше установено, че катехолът се разгражда най-бързо от щамове *P. commune* AL5 и *A. fumigatus* AL15, при които катехол-1,2-диоксигеназната активност е най-висока. Подобна зависимост се наблюдава при тези щамове и в процесите на разграждане на катехол при 10°C. Интересно е да се отбележи, че при тази температура, катехол-1,2-диоксигеназната активност в клетките на щам *P. commune* AL5, усвояващи изследваните субстрати е по-висока от измерената в опитите при 23°C. Изключение се наблюдава при разграждането на катехола, където фенол-хидроксилазната активност е изключително ниска (табл. 4). В същите експерименти беше установено, че деградацията на фенол беше силно удължена във времето, независимо от високата активност на втория ензим. Това показва, че катехол-1,2-диоксигеназният ензим в щам *P. commune* AL5, който не се влияе отрицателно от ниската температура е само един от факторите, влияещи върху скоростта на усвояване на изпитаните субстрати.

Таблица 4. Сравнение между стойностите на фенол хидроксилазата и катехол-1,2-диоксигеназата при *P. commune* AL5, *A. maritima* AL10 и *A. fumigatus* AL15 при усвояване на хидроксилирани монофеноли, като единствени въглеродни източници в култивационна среда Czarek-Dox, съдържаща 0.3 g/l фенол, при 23°C и 10°C.

Щам	Ензимна активност (U/mg P)								
	Субстрат	Фенол		Катехол		Хидрохинон		Резорцинол	
	Температура Ензим	23°C	10°C	23°C	10°C	23°C	10°C	23°C	10°C
AL5	Фенол хидроксилаза	0.179	0.126	0.264	0.01	0.228	0.322	0.304	0.233
	Катехол -1,2-диоксигеназа	0.622	0.830	2.46	0.783	0.079	0.266	0.132	0.206
AL10	Фенол хидроксилаза	-	-	0.241	0.238	0.06	-	-	-
	Катехол -1,2-диоксигеназа	-	-	0.086	0	0	-	-	-
AL15	Фенол хидроксилаза	1.07	0.134	0.17	0.171	-	-	-	-
	Катехол -1,2-диоксигеназа	1.44	1.008	4.18	1.500	-	-	-	-

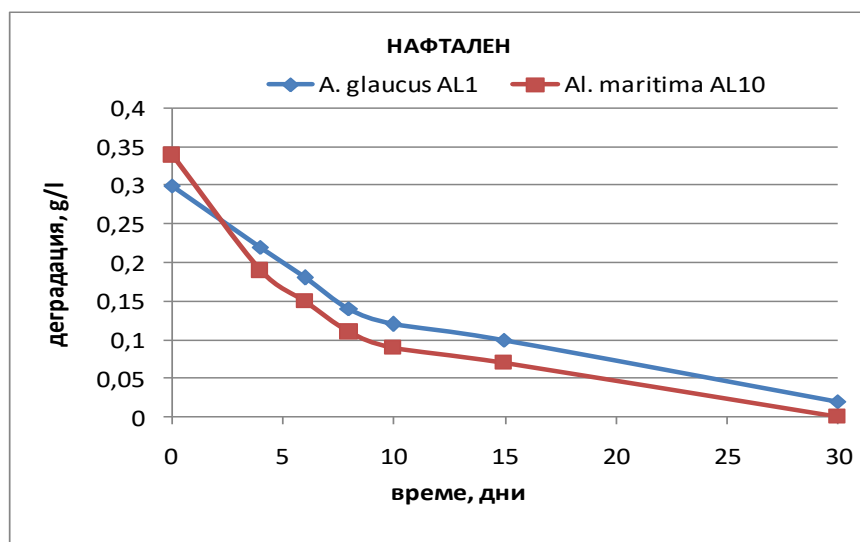
Данните от ензимния анализ, съчетани с растежните и биodeградационни характеристики показват, че плесенния щам *P. commune* AL5 е с най-добър деградационен потенциал по отношение отстраняването на широк спектър ароматни субстрати не само в мезофилни условия, но и при 10°C, като за разлика от другите изследвани в разработката психротрофи не се потиска значително от комбинираното въздействие на факторите ниска температура и наличие на токсични съединения.

Щамове *A. maritima* AL10 и *A. fumigatus* AL15 демонстрираха по-ниски ензимни активности при 10°C в сравнение с тези при 23°. Това свидетелства за по-силното стресово въздействие, което оказват върху двата щам, ниската температура в съчетание с наличието на токсични съединения в средата.

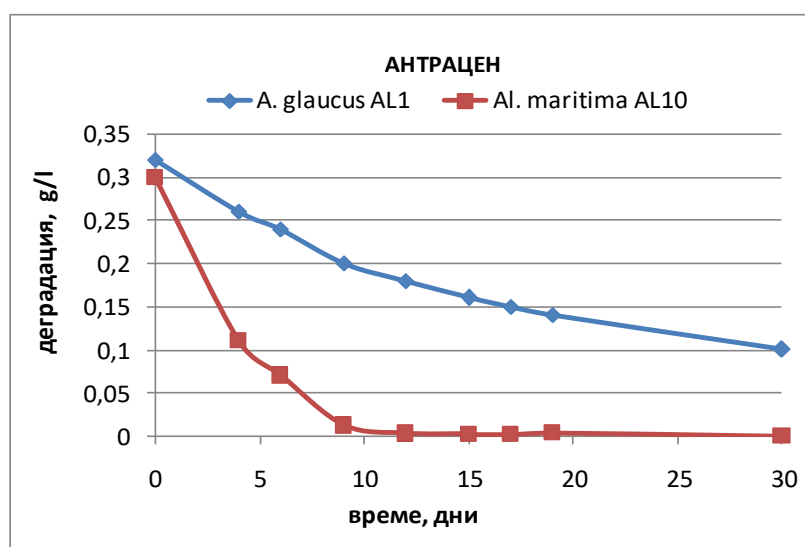
5.3. Деградация на ПАВ от антарктически fungi

В научната литература има данни за разнообразни микроорганизми, способни да осъществяват деградация на ПАВ. Докладвани са много бактериални видове, които разграждат и трансформират тези съединения с различна скорост, но данните за деградация от еукариотни

микроорганизми са твърде малко. Редица автори съобщават, че фунгите не са в състояние да разграждат ПАВ като единствен въглероден източник, а за тази цел изискват наличие на кометаболити. В настоящето проучване беше постигната пълна деградация на 0.3 g/l нафтален от *A. fumigatus* AL1 и *A. maritima* AL10, пълна деградация на 0.3 g/l антрацен от *A. maritima* AL10 и напълно елиминиране на 0.3 g/l фенантрен от *A. fumigatus* AL3 и *A. fumigatus* AL9 като единствени източници на въглерод и енергия без добавяне на кометаболити.



Фиг. 25. Деградация на нафтален от щамове *A. glaucus* AL1 и *A. maritima* AL10, култивирани при температура 23°C.

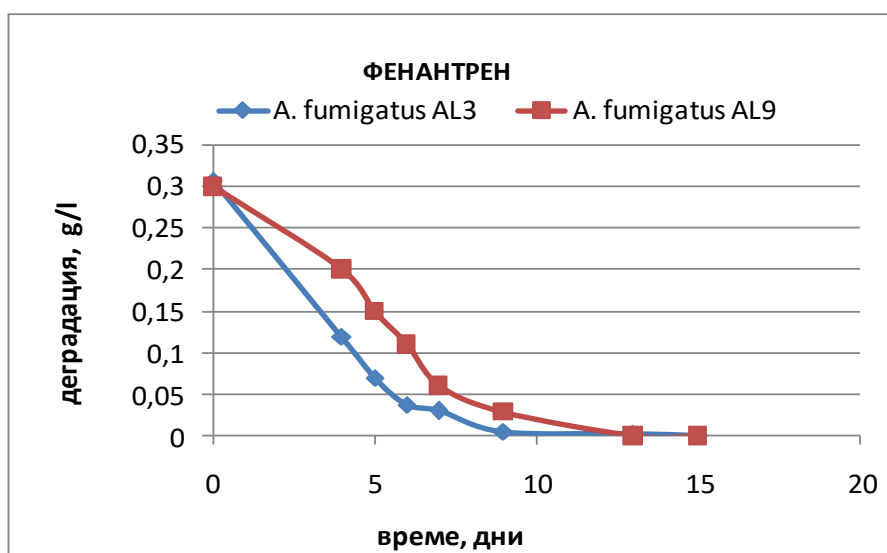


Фиг. 26. Деградация на антрацен от щамове *A. glaucus* AL1 и *A. maritima* AL10, култивирани при температура 23°C.

На фигури 25, 26 и 27 са представени деградационни криви, отразяващи разграждането на нафтален, антрацен и фенантрен от изследваните щамове, способни най-ефективно да разграждат тези съединения, като единствени източници на въглерод и енергия, при температура 23°C. До настоящия момент няма докладвани данни за деградационната активност на представители на *A. glaucus* по отношение на полиароматни съединения. Представените данни са първи в литературата.

Проследяването на деградацията на нафтаден и антрацен от шам *A. glaucus* AL1 за по-дълъг период от време показва, че за пълна деградация на 0.3 g/l нафтаден и 0.3 g/l антрацен се осъществява за 30 дни (Фиг. 25 и 26). Това показва, че шамът се проявява като добър биодegradант на нафтаден и антрацен. Също така, 30 дни са необходими за пълното отстраняване на нафтадена и антрацена от шам *A. maritima* AL10, който проявява силната деградационна активност спрямо това полиароматно съединение.

Пълна деградация на фенантрен от шамове *A. fumigatus* AL3 и *A. fumigatus* AL9 е показана на фиг. 27. Може да се посочи, че шамове *A. fumigatus* AL3 и *A. fumigatus* AL9 са добри деграданти на фенантрен и притежават потенциал да послужат като деградационни агенти в бъдещи биотехнологични приложения, свързани с елиминиране на фенантрен от замърсена среда. За сравнение, Meléndez-Estrada, 2006, докладва за висока скорост на деградация на 0.2 g/l фенантрен, извършена от *Penicillium frequentans*, който за 17 дена култивиране при оптимални условия успява да елиминира 52% от субстрата. Използваните от нас шамове *A. fumigatus* AL3 и *A. fumigatus* AL9 постигат пълна деградация на 0.3 g/l от това съединение съответно за 13 и 15 дена период на култивиране.

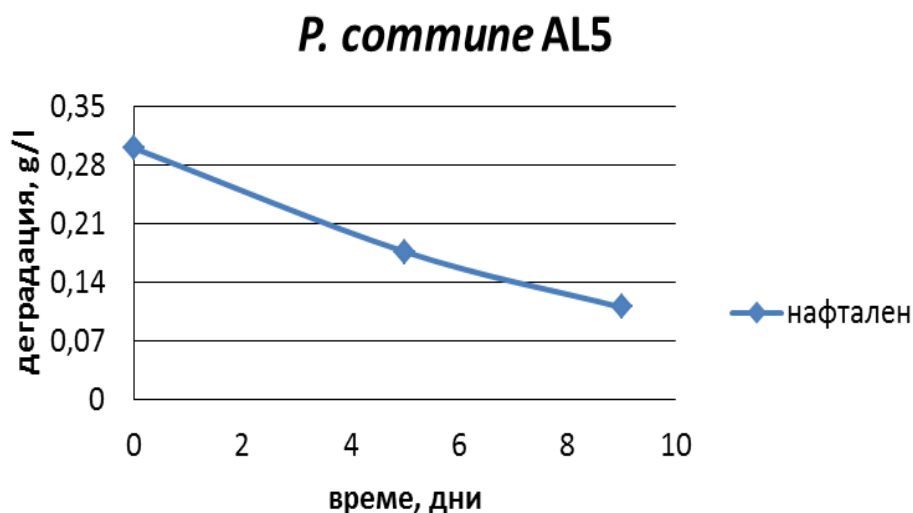


Фиг. 27. Деградация на фенантрен от шамове *A. fumigatus* AL3 и *A. fumigatus* AL9, култивирани при температура 23°C.

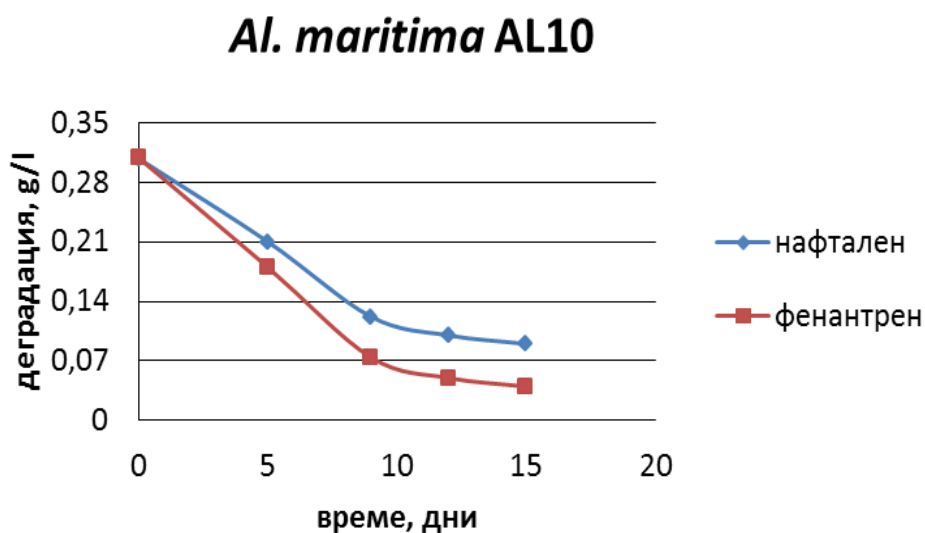
На Фиг. 28 и 29 са демонстрирани възможностите на шамове *P. commune* AL5 и *A. maritima* AL10 да разграждат и усвояват ПАВ, като единствени въглеродни източници при температура от 10°C.

Установи се, че *P. commune* AL5 осъществява частична деградация на нафтаден от 0.3 g/l до 0.11 g/l за 9 дни култивиране. Резултатите за деградация на нафтаден и фенантрен от *A. maritima* AL10 отново показаха частична деградация на субстратите за продължителност на култивиране от 15 дни. Беше постигната деградация на фенантрен до 87% от началната концентрация, което е забележителен резултат за такъв кратък период от време, при култивиране на 10°C.

Трябва да се отбележи, че получените данни за деградационния потенциал на шамове *P. commune* AL5 и *A. maritima* AL10 са оригинални и са първите проучвания за деградация на ПАВ от представители на тези видове микроорганизми.



Фиг. 28. Деградация на нафтаден от щам *P. commune* AL5, култивиран при 10°C.



Фиг. 29. Деградация на нафтаден и фенантрен от щам *A. maritima* AL10, култивиран при 10°C.

5.4. Междинни метаболити, открити при деградация на ПАВ

Изследването на микробните катаболитните механизми на ПАВ е предмет на сериозно внимание на учените, занимаващи се с биоразграждането им. Те са по-подробно изучени при бактерии, но поради обективните трудности при работа с еукариотни микроорганизми, данните за тези процеси при тях са все още непълни и често противоречиви. Трудно е да се проследят всичките междинни съединения, тъй като често те съществуват в ниски концентрации и за много кратко време.

В настоящата разработка, в процеса на разграждане на нафтаден, антрацен и фенантрен, на GC-MS – анализи бяха подложени проби от културалната среда в различни етапи от култивирането на щамове *A. glaucus* AL1, *A. fumigatus* AL3, *P. commune* AL5, *A. fumigatus* AL9, *A. maritima* AL10, за които беше доказано, че са способни да разграждат трите полиароматни съединения. В Табл. 8 са представени междинните метаболити, открити в процеса на разграждане на полициклични въглеводороди от изброените Антарктически щамове фунги.

Таблица 5. Междинни метаболити, открити от масспектралните анализи при разграждането на полициклични въглеводороди от щамове *A. glaucus* AL1, *A. fumigatus* AL3, *P. commune* AL5, *A. fumigatus* AL9, *A. maritima* AL10.

Щам	нафтален	антрацен	фенантрен
AL1	Салицилова киселина; Катехол; Кетоадипинова киселина	2-хидрокси-1-нафтоена киселина; <i>o</i> – фталат, протокатехат	1-хидрокси-2-нафтоена киселина; 1-нафтол
AL3			1-хидрокси-2-нафтоена киселина; 1-нафтол; <i>o</i> – фталат; протокатехат
AL5 (10°C)		9, 10 – дихидроксиантрацен	1-хидрокс-2-нафтоена киселина
AL9		9, 10– дихидроксиантрацен; 9,10 - антрахинон	1-хидрокси-2-нафтоена киселина; 1-нафтол; <i>o</i> – фталат; протокатехат
AL10 (10°C)	1,2 – дихидрокси-нафтален; Салицилалдехид; Салицилова киселина; Катехол		1 – хидрокси – 2 - нафтоена киселина; 1 – нафтол; <i>o</i> – фталат; протокатехат

При култивиране на щам *A. glaucus* AL1 в среда, съдържаща нафтален са открити съединенията салицилова киселина, катехол и кетоадипинова киселина, което показва ясно съвпадение с метаболитите от втората част на пътя на деградация на нафтален описан по-рано при аеробни бактерии. Наличието на *o*-фталат и протокатехуат в културалната среда на *A. glaucus* AL1 деградиращ антрацен съвпада с част от пътя на деградация на това съединение, предложен за някои анаеробни бактерии. Наличието на 2– хидрокси – 1- нафтоена киселина е изненадващо, тъй като до момента е открито при разграждане на антрацен от аеробни бактерии, но не е откривано при фунги.

Наличието на 1– хидрокси – 2 - нафтоена киселина при разграждането на фенантрен от петте изследвани щамове, както и 1 – нафтол при *A. glaucus* AL1, *A. fumigatus* AL3, *A. fumigatus* AL9 и *A. maritima* AL10, *o*-фталат и протокатехат при щамове AL3, AL9 и AL10 дават основание да се предположи, че при тези плесени фенантренът се разгражда по пътя на фталовата киселина, описан при факултативните или облигатни аеробни бактерии *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus* и *Micrococcus*.

Масспектралният анализ на пробата от културалната течност на щам *A. maritima* AL10, проследяващ деградация на нафтален установи наличието на съединенията 1,2– дихидрокси-нафтален, салицилалдехид, салицилова киселина и катехол. Съединенията 1,2– дихидрокси-нафтален и салицилалдехид са описани при деградацията на нафтален от *Pseudomonas putida* CSV86.

В процеса на разграждане на антрацен щамове *P. commune* AL5 и *A. fumigatus* AL9 е регистрирано съединението 9, 10–дихидроксиантрацен, а при щам *A. fumigatus* AL9 - 9,10 – антрахинон. Тези съединения са установени при деградацията на антрацен от *Mycobacterium* sp. strain PYR-1.

Прави впечатление, че описаните съединения са част от катаболитните продукти в различни схеми на разграждане на ПАВ от бактерии. Няма съответни данни за сравнение с процесите при плесени. Съединения като салицилова киселина и катехол се срещат в почти всички разградни процеси, поради което не могат да служат като ясни маркери за конкретен биохимичен път на разграждане.

5.5. Ключови ензимни активности в клетките на изследваните щамове при усвояване на нафтаден, антрацен и фенантрен, като въглеродни субстрати.

Извършени са множество изследвания, описващи катаболитни вериги на ПАВ при аеробни бактерии и лигнолитични фунги, но все още информацията относно ензимите, участващи в деградацията на ПАВ при нелигнолитични фунги е недостатъчна.

Таблица 6. Сравнение между стойностите на фенол хидроксилазата и катехол-1,2-диоксигеназата при *A. glaucus* AL1, *A. fumigatus* AL3 и *A. fumigatus* AL9, култивирани в минерална среда Czarek-Dox, съдържаща 0.3 g/l нафтаден, антрацен и фенантрен като единствен въглероден източник на 23°C.

ЩАМ	Ензимна активност (U/mg P)			
	Ензим	нафтаден	антрацен	фенантрен
AL 1	Фенол хидроксилаза	1.48	1.12	0.049
	Катехол -1,2-диоксигеназа	0.24	0.16	0.0165
AL3	Фенол хидроксилаза	0.700	0.780	0.05
	Катехол -1,2-диоксигеназа	0.108	0.064	0.06
AL9	Фенол хидроксилаза	0.320	0	0.054
	Катехол -1,2-диоксигеназа	0.112	0.181	0

Резултатите, получени за ензимните активности на фенол хидроксилазата и катехол-1,2-диоксигеназата в клетките на щамове *A. glaucus* AL1, *A. fumigatus* AL3, *P. commune* AL5, *A. fumigatus* AL9 и *A. maritima* AL10, култивирани в среда, съдържаща 0.3 g/l нафтаден, антрацен или фенантрен са представени в таблици 6 и 7. Активността на фенол хидроксилазата и катехол-1,2-диоксигеназата за щамове *A. glaucus* AL1 и *A. fumigatus* AL3 бяха много сходни при субстрати антрацен и нафтаден, докато при субстрат фенантрен двете активности значително се различаваха една от друга. Това показва, че активността на двата ключови ензима се влияе съществено от фенантрена, използван като въглероден субстрат. Не беше установена фенол хидроксилазна активност при усвояване на антрацен от щам *A. fumigatus* AL9, както и в клетки на щам *P. commune* AL5, култивирани с трите полиароматни субстрата при ниска температура. Във всички останали случаи фенол хидроксилазната активност варира в широки граници – от 0.040 U/mg P до 1.123 U/mg P. За повечето щамове, култивирани в среда, съдържаща ПАВ на 23°C и 10°C е открита катехол-1,2-диоксигеназна активност. Това потвърждава фактът изказван по-рано, че катехолът е централен метаболит в разграждането на ароматни съединения.

Като резултат от проведения анализ възниква интересен въпрос относно ролята на фенол хидроксилазата в процеса на деградация на нафтаден, антрацен и фенантрен. Публикувани са проучвания посветени на P₄₅₀ изозими, на практика идентични с бензен и фенол хидроксилаза в микрозомни от хепатити на зайци. Въз основа на тези проучвания и фактът, че цитохром P₄₅₀ оксигеназите изпълняват важни роли в деградацията на ПАВ при

фунги, може да се предположи, че фенол хидроксилазата се индуцира или от изследваните съединения, или от някой от метаболитите, който се получава в хода на тяхната трансформация.

Таблица 7. Сравнение между стойностите на фенол хидроксилазата и катехол-1,2-диоксигеназата при *Penicillium commune* AL5 и *A. maritima* AL10, култивирани в минерална среда Czapek-Dox, съдържаща 0.3 g/l нафтаген, антрацен и фенантрен като единствен въглероден източник на 23°C и 10°C.

Щ А М	Ензимна активност (U/mg P)						
	Субстрат	Нафтаген		Антрацен		Фенантрен	
	Температура						
	Ензим	23°C	10°C	23°C	10°C	23°C	10°C
AL 5	Фенол хидроксилаза	0	0.040	0	0.05	0	0.045
	Катехол -1,2-диоксигеназа	0.176	0.055	0.193	0.023	0.204	0.103
AL 10	Фенол хидроксилаза	0.270	0.115	1.123	-	1.013	0.055
	Катехол -1,2-диоксигеназа	0.130	0.098	0	-	0.050	0

Микробното разнообразие, включително и това при фунгите е огромно, от където идва и огромното разнообразие в механизмите, по които тези организми се приспособяват и успяват да съществуват в изключително екстремни от човешка гледна точка условия на живот. Следователно разнообразни са и гените, кодиращи ензимите, включени в катаболизма на ПАВ, като това разнообразие нараства с помощта на механизмите на т. нар. хоризонтален трансфер, фузия на клетки и протопласти и други механизми за генетичен трансфер. Оригиначните данни, получени в хода на настоящото изследване дават своя принос в изясняване на механизмите на биодеградацията на полиароматните въглеводороди в тези родове фунги.

5.6. PCR - амплификация и ДНК - секвениране на гени кодиращи ензима фенол хидроксилаза в изследваните щамове микроорганизми

Извършеният ДНК-анализ разкрива наличието на нуклеотидна последователност, типична за гени, кодиращи ключови за метаболизма на ароматни съединения ензими. Сравнението, извършено за получената аминокиселинна секвенция на *A. fumigatus* AL3 с тази на други представители на FAD-зависими монооксигенази разкрива между 36 и 45% сходна област при отделните последователности. Получените резултати потвърждават наблюдението, че независимо от сходното нагъване, типично за флавин-съдържащите ароматни монооксигенази техните аминокиселинни секвенции могат да варират в значителна степен (Фиг. 30).

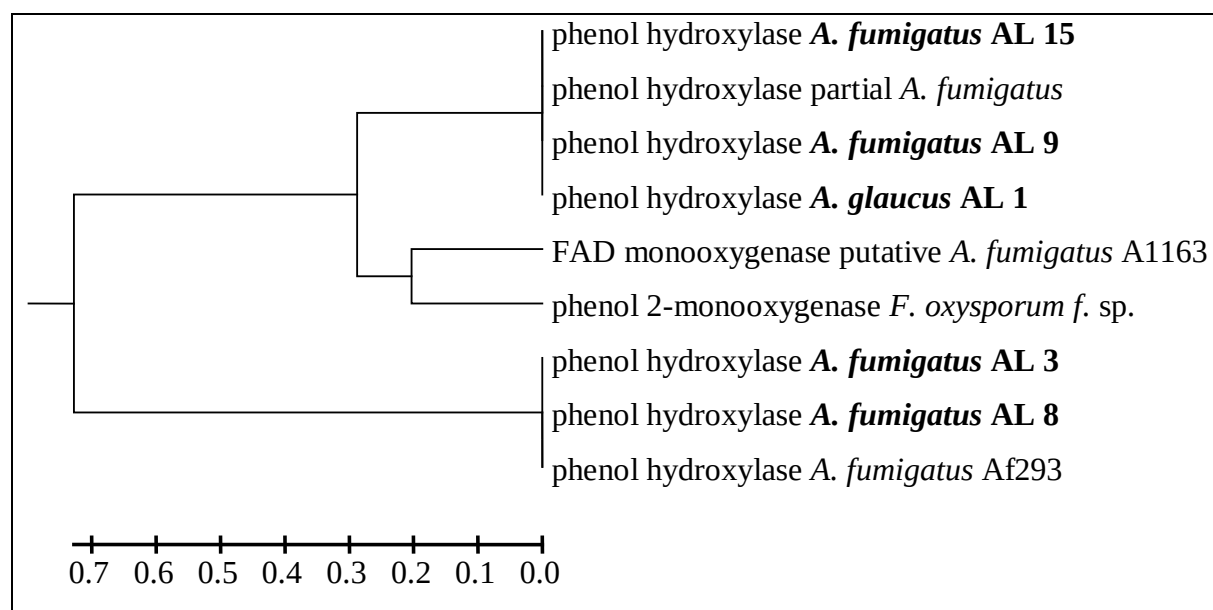
Подобно сравнение беше извършено и за катехол диоксигеназния ензим при различни представителни на *Aspergillus* (Фиг. 31). Последователността, в която е разположен желязо-свързващия участък при *A. fumigatus* AL3 показва 98.5% идентичност с тези при *A. glaucus* AL1и *A. fumigatus* AL15. Отново се забелязва наличието на консервативен мотив на фона на значителната разлика в аминокиселинната последователност в останалата част от молекулата.

1.	R	V	F	L	G	G	D	A	V	H	T	H	T	P	K	G	G	Q	G	M	N	V	S	M	Q	D	A	Y	N	L	G	W	K	L
2.	R	I	F	I	A	G	D	A	C	H	T	H	S	P	K	A	G	Q	G	M	N	A	S	M	N	D	T	H	N	L	I	W	K	L
3.	R	V	T	L	L	G	D	A	A	H	P	T	T	Q	Y	M	A	Q	G	A	C	M	A	M	E	D	G	V	T	L	G	E	A	L
4.	R	V	C	C	A	G	D	A	I	H	K	H	P	P	S	H	G	L	G	S	N	T	S	I	Q	D	S	Y	N	L	C	W	K	L
5.	R	V	E	C	A	G	D	A	V	H	R	H	P	P	T	N	G	L	G	S	N	T	S	I	Q	D	S	F	N	L	A	W	K	I
6.	R	V	E	I	A	G	D	A	C	H	T	H	S	P	K	A	G	Q	G	M	N	T	S	M	M	D	T	Y	N	L	G	W	K	L
7.	R	V	F	L	G	G	D	A	V	H	T	H	T	P	K	G	G	Q	G	M	N	V	S	M	Q	D	A	Y	N	L	G	W	K	L
8.	R	V	F	L	G	G	D	A	V	H	T	H	T	P	K	G	G	Q	G	M	N	V	S	M	Q	D	A	Y	N	L	G	W	K	L
9.	R	V	E	L	A	G	D	A	V	H	T	H	S	P	K	A	G	Q	G	M	N	V	S	M	Q	D	A	Y	N	L	G	W	K	L

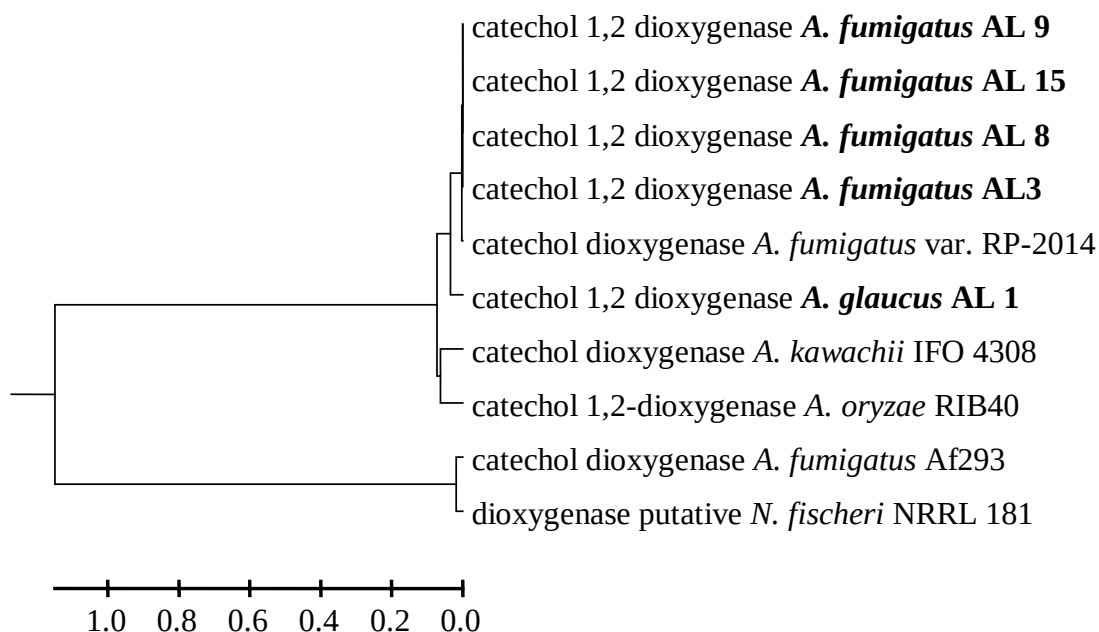
Фиг. 30 Анализ на аминокиселинната последователност на втория FAD – свързващ участък на флавин-съдържащ белтък с монооксигеназна активност (отбелязаните аминокиселини илюстрират секвенцията на консервативен GD-мотив). 1. *A. glaucus* AL1 (NCBI Acc. N AIY27717.1), *A. fumigatus* AL3 (NCBI Acc. N AMM02733.1), *A. fumigatus* AL9 (NCBI Acc. N AFJ97046.1) и *A. fumigatus* AL15 (NCBI Acc. N AMA07787.1); 2. *Phanerochaete chrysosporium* (Nakamura et al., 2012.); 3. *Polaromonas naphthalenivorans* (Park et al., 2007); 4. *Pseudomonas* sp. (Nurk et al., 1991); 5. *Alcaligenes eutrophus* (Perkins et al., 1990); 6. *Trichosporon cutaneum* ATCC 46490 (L04488.1); 7. *A. fumigatus* AL8 (Gerginova et al., 2013); 8. *A. fumigatus* Af293 (XM_743491.1); 9. *Neosartorya fischeri* NRRL 181 (XP_001265717.1).

1.	N	G	L	Y	E	C	O	D	P	N	O	E	E	F	N	L	R	G	K	F	K	T	D	A	D	G	R	Y	F	Y	C	L	R	P	T	P	P	V	P	N	D	G	P	A	G	K	L	E	L	M	D	R	H	P	F	R	P	A	H	I	E	I	A		
2.	N	G	L	Y	E	C	O	D	P	N	O	E	E	F	N	L	R	G	K	F	K	T	D	A	D	G	R	Y	F	Y	C	L	R	P	T	P	P	V	P	N	D	G	P	A	G	K	L	E	L	M	D	R	H	P	F	R	P	A	H	I	E	I	A		
3.	R	G	T	Y	S	F	F	D	C	S	Q	S	A	Y	N	L	R	R	R	I	V	T	D	A	Q	G	R	Y	R	A	S	I	V	P	S	Q	Y	G	C	D	P	Q	G	P	T	Q	E	C	L	D	L	L	G	R	H	G	R	P	A	H	V	H	E	F	I

Фиг. 31. Анализ на аминокиселинната последователност на желязо-свързващ белтък с катехол-1,2-диоксигеназна активност от: *A. fumigatus* AL3 (NCBI Acc. N KT781126), 2. *Aspergillus fumigatus* Af293 (XM_744333), 3. *Pseudomonas arvilla* C-1 изозим α (Nakai et al., 1996). Отбелязаните 4 аминокиселини образуват желязо-свързващ участък.



Фиг. 32. Кладограма, създадена въз основа на аминокиселинни секвенции, изведени за фенол хидроксилаза за различни щамове *Aspergillus* и съответните им секвенции, публикувани в база данни NCBI.



Фиг. 33. Кладограма, създадена въз основа на аминокиселинни секвенции, изведени за катехол-1,2-диоксигеназа за различни щамове *Aspergillus* и съответните им секвенции, публикувани в база данни NCBI.

Въз основа на аминокиселинните последователности, получени за ензимни протеини с фенол хидроксилазна и катехол-1,2-диоксигеназна активност при щамове *A. fumigatus* (AL3, AL8, AL9, AL15) и съответните им секвенции в базата данни на NCBI, отразяващи значителната идентичност в последователността на тези ензими при различни представители на *A. fumigatus* бяха създадени съответни кладограми. В тези групи ензимни протеини с подобни аминокиселинни секвенции се включват и съответните аминокиселинни секвенции, получени при анализа на двата ензима в клетки на *A. glaucus* AL1 (Фиг. 32, Фиг. 33).

Като заключение от извършените анализи и сравнения може да се твърди, че настоящият експеримент, свързан с ДНК-секвениране на двата гена от интерес, доведе до идентифицирането на катаболитни гени, кодиращи ензими с ключова роля в деградацията на високотоксични ароматни съединения като фенови и фенолни деривати.

5.7. Полиекстремофилност на щамове *A. fumigatus* AL1, *A. fumigatus* AL3, *P. commune* AL5 и *A. fumigatus* AL 9, *A. maritime* AL10 и *A. fumigatus* AL15

Списъкът на "екстремните" условия, които определят термина „екстремофили“ се разширява поради откриването на все по-необичайни от гледна точка на физико-химичните условия области на планетата, обитавана от микроорганизми. Специален принос в това отношение имат и проучванията, свързани с Космоса. От друга страна, практически ежедневно се увеличава както броят, така и филогенетичното многообразие на микроорганизмите, които могат да оцеляват и живеят в екстремни условия от гледна точка на хората. В този контекст изглежда, че токситолерантните микроорганизми, способни да оцеляват при условия на високи концентрации на вредни вещества като ароматни и полиароматни съединения, йони на тежки метали, ядрени отпадъци и много други са екстремофили. Описани са и екстремофили, които са устойчиви едновременно на повече от един неблагоприятен фактор, като ниска температура, висока киселинност, наличие на кислород, ограничени хранителни условия, високи концентрации на соли и т.н. Те са цитирани в литературата като полиекстремофили.

Classification of Microorganisms by Temperature Requirements

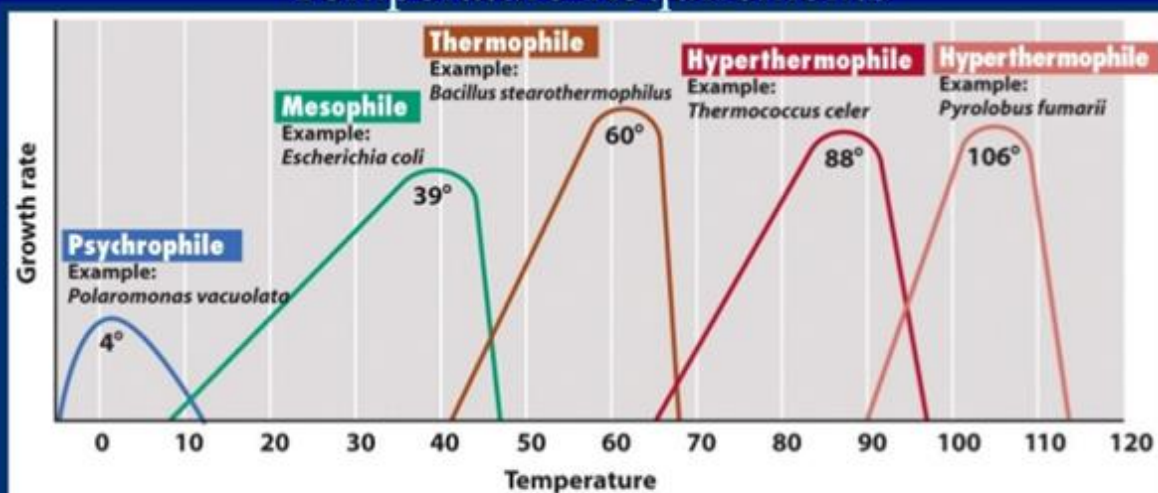


Figure 6-17 Brock Biology of Microorganisms 11/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

Фиг. 34. Класификация на микроорганизмите спрямо температурата на разтеж и развитие. (<https://www.slideshare.net/RayPatrickSalarda/lecture-3-bacterial-nutrition-and-growth>)

В настоящата разработка бе доказано, че изследваните от нас шест плесенни щама *A. glaucus* AL1, *A. fumigatus* AL3, *P. commune* AL5, *A. fumigatus* AL 9, *A. maritima* AL10 и *A. fumigatus* AL15, изолирани от антарктически почви, са токситолерантни фунги, способни да разграждат фенол, хидроксилирани и метилирани деривати на фенола, както и ПАВ. Те растат и се развиват бедна на хранителни вещества солева среда, тъй като ароматните съединения се прибавят към минералната хранителна среда за култивиране като единствени източници на въглерод, което ги характеризира и като олиготрофи. Щамове *P. commune* AL5, *A. maritima* AL10 и *A. fumigatus* AL15 показат способност да растат и функционират в условия, както на ниска, така и на умерена температура – 10°C и 23°C, което го причислява към психротрофните микроорганизми.

В заключение можем да твърдим, че всички изследвани от нас щамове и особено *P. commune* AL5, *A. maritima* AL10 и *A. fumigatus* AL15 могат да бъдат дефинирани като истински полиекстремофили.

ИЗВОДИ

1. Изследвани са 16 плесенни щама с Антарктически произход и е установен потенциала на 4 щамове *Aspergillus*, 1 щам *Penicillium* и 1 щам *Alternaria* да разграждат широк спектър моно и полиароматни съединения.
2. Щамове *A. fumigatus* AL3, *A. fumigatus* AL15, *P. commune* AL5 и *A. maritima* AL10 растат и запазват значителен катаболичен потенциал при 10°C, което ги причислява към психротрофните микроорганизми. Останалите изследвани щамове са мезофили.
3. За първи път е установена деградационна активност по отношение на ароматни съединения на представител на вид *A. glaucus*. Щам *A. glaucus* AL1 е способен да разгражда напълно 0.3 g/l фенол, катехол, хидрохинон, *o*-, *m*-, *p*- крезол и нафтаден, както и 69% и 20% съответно от 0.3 g/l антрацен и фенантрен при 23°C, като единствен въглероден и енергиен източник.
4. За първи път е установена деградационна активност по отношение на ароматни съединения на представител на вид *P. commune*. При 23°C, щам *P. commune* AL5 е способен да разгражда напълно, като единствен въглероден и енергиен източник 0.3 g/l фенол, катехол, хидрохинон и 33% *p*-крезол, както и 62%, 80% и 65% съответно от 0.3 g/l нафтаден, антрацен и фенантрен. При 10°C, щам *P. commune* AL5 осъществява разграждане на 0.3 g/l *p*-крезол и 63% нафтаден, 11% антрацен и 15% фенантрен.
5. За първи път е установена деградационна активност по отношение на ароматни съединения на представител на вид *A. maritima*. Щамът *A. maritima* AL10 е способен да расте и разгражда напълно, като единствен въглероден и енергиен източник 0.2 g/l фенол, 0.3 g/l катехол, хидрохинон, нафтаден и антрацен, както и 35% от 0.3 g/l фенантрен за 6 дни при 23°C. При 10°C, щам *A. maritima* AL10 разгражда напълно 0.3 g/l катехол и хидрохинон и частично - нафтаден (70%) и фенантрен (87%), като единствен въглероден и енергиен източник, за 15 дни.
6. Установено е, че щамове *A. fumigatus* AL3 и *A. fumigatus* AL9, при 23°C са способни да усвояват напълно, като единствен източник на въглерод и енергия, 0.3 g/l фенол, катехол, хидрохинон, *o*, *m*- крезол и фенантрен. Щамовете разграждат частично нафтаден (36% и 53% съответно) и антрацен (24% и 75% съответно) от същата начална концентрация.
7. Щам *A. fumigatus* AL15 е способен да разгражда 0.3 g/l фенол, катехол и *o*-крезол при култивиране на 23°C и 0.3 g/l фенол и катехол, при култивиране на 10°C. Щамът не разгражда нафтаден, антрацен и фенантрен.
8. Наличието на фенол хидроксилазна и катехол-1,2-диоксигеназна активности в клетките на всички изследвани щамове показват ключовата роля на тези ензими в деградацията на ароматни съединения по *ortho*-механизъм при плесени.
9. Установени са характерни междинни метаболити при разграждането на изследваните ПАВ, които показват сходство с метаболитното разграждане при бактерии. За първи път е установено наличието на 2 – хидрокси – 1- нафтоена киселина, като метаболит при микробно разграждане на нафтаден.
10. Идентифицирани и частично секвенирани са гени, кодиращи протеини с фенол хидроксилазна и катехол 1,2-диоксигеназна активност в щамове *A. glaucus* AL1, *A. fumigatus* AL3 и *A. glaucus* AL15.
11. Изследваните щамове *A. glaucus* AL1, *A. fumigatus* AL3, *P. commune* AL5, *A. fumigatus* AL9, *A. maritima* AL10 и *A. fumigatus* AL15 са токситолерантни и олиготрофни микроорганизми, а част от тях са психротрофи, поради което могат да бъдат дефинирани като полиекстремофили.

ПРИНОСИ

1. Получени са оригинални данни с теоретично и приложно значение за деградацията на фенол, фенолни производни и нискомолекулни полиароматни съединения от представители на *Aspergillus glaucus*, *Penicillium commune* и *Alternaria maritima*.
2. Разширена е теоретичната база от данни за деградацията на ПАВ при нелигнинолитични фунги.
3. Характеризирани са плесенни щамове, изолирани от Антарктически почви, притежаващи значителен биодеградиционен потенциал по отношение на фенол, фенолни производни и ПАВ при 23°C и 10°C.
4. За първи път са секвенирани гени, кодиращи ензими с фенол хидроксилазна и с катехол-1,2-диоксигеназна активност при представител на вид *Aspergillus glaucus*.
5. Важни от теоретична и практическа гледна точка са получените оригинални данни за присъствието на ключови ензими при усвояване на фенолните и полиароматните съединения в представители на видовете *Aspergillus glaucus*, *Penicillium commune* и *Alternaria maritima*.
6. За първи път при фунги е установено наличието на висока фенол хидроксилазна активност при култивирането на щам *Aspergillus glaucus* AL1, в среда, включваща нафтаген и антрацен, като единствен източник на въглерод.
7. Най-висока фенол хидроксилазна активност (1.48 U/mg P) е установена в клетки на щам *A. glaucus* AL1, култивиран в среда, съдържаща нафтаген, като единствен въглероден субстрат.
8. В клетки на щам *A. fumigatus* AL15, култивиран в среда, съдържаща катехол е установена най-високата катехол-1,2-диоксигеназна активност (4.18 U/mg P) при 23°C

Публикации, свързани с дисертацията:

- Litova, K., Gerginova, M., Peneva, N., Manasiev, J., Alexieva, Z. Growth of Antarctic fungal strains on phenol at low temperatures. (2014) J. BioSci. Biotechnol., SE, 9, 2, 43-46
- Gerginova M., Litova K., Manasiev J., Peneva N., Alexieva Z. 2014, Analyses of enzymes involved in the degradation of catechol and o-cresol by *Aspergillus fumigatus* strain, isolated from Antarctic soil. Journal of Biotechnology, 185S S37–S125 S61. IF – 2.871
- Litova, K., Manasiev, J., Gerginova, M., Peneva, N., Alexieva Z. Sequence analyses of genes coding key enzymes responsible for degradation of phenolic compounds by *Aspergillus fumigatus* strain AL3 (2015) J. BioSci. Biotechnol., SE/ONLINE: 195-203, ISSN:1314-6246
- Alexieva Z., Gerginova M., Manasiev J., Peneva N., Litova K. Catabolic potential related to the aromatic pollutants biodegradation by fungal strains isolated from Antarctic soils. J. Biotechnol. Biomater., 2014, 3(5), 101.
- Gerginova M., Litova K., Peneva N., Alexieva Z. Microbial degradation of phenol and phenol derivatives by *Aspergillus fumigatus* strain AL15, isolated from Antarctic soil. Microbiology for better health and industry, 70 years the Stephan Angeloff Institute of Microbiology, Sofia, 2017.
- Gerginova M., Litova K., Manasiev J., Peneva N., Bibova R., Krastanov A., Alexieva Z. 2016, Studies on biodegradation of phenolic compounds by *Aspergillus glaucus* strain. In: "Microbes in the spotlight: recent progress in the understanding of beneficial and harmful microorganisms", ed. Antonio Mendez – Vilas, BrownWalker Press, 135-139. ISBN-10: 1627346120, ISBN-13: 9781627346122. (60p III 2)

Участия в национални научни форуми:

- Литова К., Гергинова М., Алексиева З., 2014, Растеж на антарктически щамове фунги и усвояване на фенол при ниски температури. Доклад на докторантски симпозиум на тема "Молекулярната биология - отблизо. Предизвикателства и перспективи", 1-2 декември 2014, Институт по молекулярна биология БАН, София, България.

- Gerginova M., Litova K., Peneva N., Alexieva Z., Microbial degradation of phenol and phenol derivatives by *Aspergillus fumigatus* strain AL15, isolated from Antarctic soil. 70 years the Stephan Angeloff Institute of Microbiology, Sofia, 2017

Участия в международни научни форуми:

- Alexieva Z., Gerginova M., Manasiev J., Manasiev J., Litova K. Участие в V Световен конгрес по Биотехнология, 2014, Catabolic potential related to the aromatic pollutants biodegradation by fungal strains isolated from Antarctic soils., 25-27 н, 2014, Валенсия, Испания, J. Biotechnol. Biomater. 3(5), 101.
- M. Gerginova, K. Litova, J. Manasiev, N. Peneva, R. Bibova, A. Krastanov and Z. Alexieva, Участие в VI International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology, 2015, Studies on biodegradation of phenolic compounds by *Aspergillus glaucus* strain, October 28 – 30th 2015, Barcelona, Spain;

Участие с постерни презентации:

- Litova K., Gerginova M., Peneva N., Manasiev J., Alexieva Z., 2014, Growth of Antarctic fungal strains on phenol at low temperatures. Proc. 3rd Balkan Sci. Conf. on Biology, May 30th – June 1st, 2014, Plovdiv, Bulgaria.
- Katya Ts. Litova, Jordan S. Manasiev, Maria G. Gerginova, Nadejda M. Peneva, Zlatka M. Alexieva, 2015, Sequence analyses of genes coding key enzymes responsible for degradation of phenolic compounds by *Aspergillus fumigatus* strain AL 3, 2nd National Conference for Young Researchers - BioSciences for Better Future October 30 – 31, 2015, Plovdiv, Bulgaria;
- Litova KT, Gerginova MG, Dincheva IN, Manasiev JS, Peneva NP, Alexieva ZM, Участие в Second conference on the Ecology of Soil Microorganisms, Microbes as important drivers of soil processes, 2015, Studies on biodegradation of naphthalene and anthracene by *Aspergillus glaucus* strain isolated from Antarctic soil, 29.11. - 3.12. 2015, Prague, Czech Republic.
- Maria Gerginova, Katya Litova, Jordan Manasiev, Nadejda Peneva, Zlatka Alexieva, Участие в European Biotechnology Congress Analyses of enzymes involved in the degradation of catechol and *o*-cresol by *Aspergillus fumigatus* strain, isolated of Antarctic soil, 15-18 may 2014, Lecce, Italy

БЛАГОДАРНОСТИ

Искам да изкажа най-сърдечните си благодарности на първо място към моя научен ръководител Доц. д-р Златка Алексиева, за безценните напътствия и съвети, за упоритостта в насърчаването, за търпението, разбирането и съпричастността, каквито рядко се срещат на друго място.

Благодаря на консултанта си Гл. ас. д-р Мария Гергинова за отзивчивостта и многоценната помощ при изпълнението на експерименталната дейност и оформянето на дисертационния труд, за напътствията, търпението и съветите.

Благодаря също така на Ас. Надежда Пенева за безотказното съдействие в подготовката и изпълнението на лабораторната дейност.

Благодаря на Доц. д-р Екатерина Крумова за непрекъснатото благоразположение към съдействие и помощ.

Бих искала да изкажа благодарности и към дипломантката Радослава Бибова, с която заедно споделяхме изпълнението на експерименталната дейност.

Благодаря ви, колеги и приятели, за това, че бяхте до мен през всичките тези години и заедно превърнахме настоящия дисертационен труд в реалност.