

## РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационен труд, представен за защита пред научно жури, сформирано със заповед № I-101/21.12.2018 на Директора на Институт по микробиология „Стефан Ангелов” при БАН за получаване на образователната и научна степен “доктор” по професионално направление 4.3. Биологични науки (микробиология)

**Тема дисертационния труд: БИОДЕГРАДАЦИЯ НА АРОМАТНИ И ПОЛИАРОМАТНИ ЗАМЪРСИТЕЛИ НА ОКОЛНАТА СРЕДА ОТ ПЛЕСЕНИ, ИЗОЛИРАНИ ОТ АНТАРКТИЧЕСКИ ПОЧВИ**

Автор на дисертационния труд: Катя Цветанова Стоянова

Рецензент: проф. Мария Ангелова, дбн

Проблемите, свързани с пречистването на околната среда от продуктите на нефтопреработвателната индустрия са едни от най-сериозните в съвременния свят. Въпреки безспорното значение на тази индустрия за икономиката на всяка страна, не може да се отмени негативния ефект от токсичните замърсявания, който се мултиплицира в различни отрасли и нарушава социално-икономическия баланс. Тук се добавя и изхвърлянето в отпадните води на силно токсични ароматни съединения като фенол, фенолни производни, пестициди и канцерогенни органични съединения. Биодеграцията е ключов феномен в процесите, целящи тяхното разграждане. Това обяснява нарастващият интерес към микробната екология и биотехнологията като всепризнати лидери в борбата за намаляване вредното въздействие на индустриализацията. Съвременните тенденции в тези две области на науката се характеризират с разработването на технологии на базата на микроорганизми, способни да усвояват определен вид замърсители. Такъв важен за науката и практиката въпрос е включен в докторската теза на Катя Стоянова. Този въпрос е част от приоритетите на страната и Европа и определя високата степен на актуалност и значимост на разработката. Актуалността се определя и от избора на обекта на изследване – антарктически филаментозни гъби. Трябва да се отбележи, че по-голямата част от публикациите в областта на биодеграцията са фокусирани върху ролята на бактериите, но през последните две десетилетия използването на микромицетите (микодеградация) все по-сериозно привлича интереса на учените и бизнеса. Гъбите са уникални организми с много предимства в тази област, а широкият ензимен профил им осигурява способността да разграждат и минерализират силно токсични съединения. Използването на микроорганизми, изолирани от региона на Антарктика също са предпоставка за оригинални приноси. Докторантката и нейният научен ръководител изхождат от

работната хипотеза, че адаптираните към екстремно студени местообитания гъби включват в метаболизма си температуро-чувствителни ензими, които успешно разграждат субстрата при температура под 20°C. Тук искам да отбележа, че това е поредната дисертация в областта на биодеградацията на токсични съединения, разработена в школата на д-р Алексиева, но както всички останали и тази има своя оригинална насока и своето самостоятелно звучене.

Основната теоретична насоченост на изследването е свързана с получаване на нови знания относно способността на антарктическите филаментозни гъби да разграждат токсични ароматни и полиароматни замърсители на околната среда. В приложен аспект, дисертацията предлага нови решения с полезен екологичен резултат - селектиране на ефективни полиекстремофилни щамове с изразен афинитет както към монофенолни съединения, така и към смеси от тях.

Дисертационният труд е конструиран в традиционна форма със съответните раздели, които са добре балансирани по обем и съдържание. Написан е на 180 стандартни компютърни страници, включващи 154 стр. текст и 26 стр. литературни източници. Материалът е онагледен с 9 таблици и 95 фигури, по-голямата част от които са комплексни. В някои от фигурите, Стоянова е проявила много творчество, за да представи големия обем от информация по разбираем начин.

Литературният обзор е представен възможно най-пълно, целенасочено и конкретно. Той запознава читателя с всички аспекти на изследването и дава необходимата информация за постигнатото на нерешените въпроси. В него са отразени общо 498 публикации, от които 7 на кирилица и останалите на латиница. Над 40% от статиите са от последните 10 години, а над 25% от последните 5, което подчертава още веднъж неговата актуалност. Много добро впечатление прави и фактът, че е включен и българският опит в този аспект, както и на колектива, в който е разработена дисертацията. Всъщност, точното определение за обзора е - пълно представяне на съвременното състояние на проблема в световен мащаб. По мое мнение, оформянето на този текст и публикуването му ще бъде принос в научната литература. Този раздел отразява интердисциплинарния характер на дисертационната теза и включва информация за токсичните ароматни и полиароматни съединения, видовете биоразграждане, характеристика на родовете с перспективни представители, молекулната база за протичането на тези процеси, ролята на щамове, изолирани от студени местообитания. Всичко това доказва, че Катя Стоянова познава много добре широк диапазон от аспекти, свързани с разработвания проблем.

Въз основа на този задълбочен анализ е изведена целта на настоящата дисертация: да се изследва способността на еукариотни микробни щамове, изолирани от антарктически региони, да разграждат токсични ароматни и полиароматни замърсители на околната среда. Според мен тя е дефинирана много по-скромно, отколкото всъщност се постига в разработката. Набелязаните задачи ясно очертават конкретните експерименти, произтичащи от целта.

Разделът "Материали и методи" демонстрира много широк набор от методи, съобразени с изискванията на всеки експеримент. Те са както рутинни, така и съвременни, микробиологични, биохимични, молекулярно-биологични и др. Впечатление прави включването на голям брой ензимни активности; получаването на клетъчни фракции; PCR - амплификация и ДНК-секвениране на гени; сравнителен секвенционен анализ; екстракция на полициклични ароматни хидровъглеродороди (ПАХ); газхроматографска-маспектрометрия и др. Освен това, методите са представени разбираемо, без излишни подробности, но достатъчно пълно, за да бъдат възпроизведени. Експериментите са проведени със съвременна апаратура, включително електронен анализатор на влага (KERN DBS Версия 1.1 03/2013), спектрофотометър Jenway 6305, ултразвуков пречистващ апарат В-3001 (VWR Int.), ротационен вакуум концентратор RVC 2-25 CD plus, апарат за GC-MS анализ (Hewlett Packard 7890), свързан с MSD 5975 оборудване, програми за секвенционен електрофоретичен анализ Sequence Scanner V1.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), превръщане на получените ДНК секвенции в аминокиселинни последователности чрез интернет базиран софтуер на ExPASy Proteomics Center, специфични праймери и съответните софтуерни продукти.

Дисертационният труд на Стоянова очертава едно сериозно научно изследване, което се отличава с мащабност и ясно изразена логическа последователност. Като достойнства на представения материал трябва да се отбележат също убедителният доказателствен материал, съвременното ниво на изпълнение и отправните точки за приложимост на резултатите. Това придава на дисертацията характеристика за цялостност и достоверност.

Разделът „Резултати” започва със селектиране на моделни щамове антарктически филаментозни гъби с изявена толерантност към два екстремни фактора - ароматни токсични съединения и ниски температури. От проучените 16 са избрани 6 щама, способни да усвояват фенол, монофенолни производни и полиароматни въглеродороди и да се развиват при температура 23 и 10°C. Тази част от работата е особено трудоемка и генерира изключително много резултати, представени от докторантката по оригинален и информативен

начин, много ясен за читателя. Оценявам дейността в първия подраздел като солидна база за следващите изследвания. Във втората серия експерименти Стоянова подробно проучва в динамика потенциала на избраните шамове да разграждат фенол и монофенолни съединения при култивиране в два температурни режима (23 и 10°C). Анализирани са възможностите на моделните шамове по отношение скоростта на разграждане и афинитета към конкретните съединения. Установени са шамове с предпочитания към резорцинол, *p*-крезол, *o*-крезол, катехол, хидрохинон, получени са данните за протичане на процеса при ниски температури.

Интерес представлява методологичният подход за проучване на механизма, който използват антарктическите гъби при разграждане на монофенолни субстрати. Докторантката доказва наличието на ключови ензими от катаболизма на фенола, а именно фенол хидроксилаза и катехол диоксигеназа при усвояване на фенол, катехол, хидрохинон, резорцинол и крезол (*o*-, *m*- и *p*-крезол). Отчетена е и зависимостта от температурата на култивиране. Въз основа на получените данни и като се има пред вид липсата на лаказна активност, се предполага, че деградацията на изпитаните ароматни съединения от моделните антарктически шамове се дължи на действието на ензимите от  $\beta$ -кетoadипатния път.

В дисертацията е отделено място и на биодegradацията на ПАХ. Поради своето широко разпространение, неподатливост към разграждане и потенциал за токсичност и канцерогенност, те са обект на особено внимание. В този смисъл, проведените изследвания повишават нивото на значимост на разработката. Много детайлно е проучен потенциала на 5 антарктически щама да разграждат нафтаден, антрацен и фенантрен. Използвана е съвременна техника - комбинация от газова хроматография и мас спекроскопия, която е без конкуренция при експерименти със сложни смеси от ароматни съединения. Катя Стоянова установява, че разграждането на изследваните ПАХ е шамово замисимо и се влияе от температурата на култивиране. Така напр. при използването на щамовете *A. fumigatus* AL3 и *A. fumigatus* AL9 се постига пълно разграждане на фенантрен и поради това са перспективни за биотехнологично приложение. В същото време *P. commune* AL5 и *A. maritima* AL10 проявяват значителна активност по отношение на нафтаден, но *P. commune* AL5 усвоява този ПАХ и при 10°C. С приносно значение са резултатите за получените междинни метаболити при биоразграждането на ПАХ от микромицети, които в литературата се срещат много рядко или се отбелязват за първи път, като напр. наличието на 2-хидрокси-1-нафтоена киселина. Въз основа на получените данни докторантката прави предположения относно механизма за разграждане на

фенантрена. За по-детайлно изясняване на този механизъм и тук е използван отбелязания по-горе подход за определяне активностите на ключовите ензими фенол хидроксилаза и катехол диоксигеназа. Като се има предвид, че катаболитните пътища на полиароматни въглеводороди често се преплитат с тези на фенола и фенолните деривати, този подраздел е реализация на идеята за получаване на нови знания в изследваната област. Данни за биодegradацията на ПАХ от антарктически представители на родовете *Aspergillus*, *Penicillium* и *Alternaria* са първите съобщения в научната литература.

Логическият завършек на представената дисертация включва впечатляваща експериментална дейност на базата на молекулярно-биологични подходи. Чрез ДНК-анализ е установена нуклеотидната последователност на гените, отговорни за синтезата на ензимите фенол хидроксилаза и катехол диоксигеназа. От тези данни са получени съответните аминокиселинни последователности на двата ензима. Последващият сравнителен анализ с данни от други представители на FAD-зависими монооксидази разкрива сходни области АК последователности. Докторантката успешно идентифицира катаболитни гени, кодиращи ензими с ключова роля в деградацията на високотоксични ароматни съединения като фенол и фенолни деривати.

На фона на изключително оскъдните познания за гените, ензимите, както и за молекулярния механизъм на разграждане на ароматни и полиароматни съединения при ниски температури, данните от дисертацията на Стоянова придобиват изключително приносно значение.

В дисертацията на Катя Стоянова е обособен раздел „Обсъждане”, който включва сравнителен анализ на получените резултати и дискусия на базата на съвременни и пряко кореспондиращи литературни данни. Искам да подчертая, че докторантката е успяла да избегне повторение на написаното в раздел „Резултати”. Дори нещо повече, по своята същност това обсъждане допълва и конкретизира получената информация. Но най-важното е, че представя доказателства за постигане на поставената цел. Тук прави впечатление задълбоченото обсъждане на щамовите зависимости относно разграждането на моно- и полиароматни токсични съединения, характеристиката на междинните метаболити, интерпретацията на експресията на гените, отговорни за разграждането, анализът на АК последователност на ключовите ензими и създадените кладограми, както и значението на полиекстремофилността за деградационния потенциал.

Много добра идея е представеното в края на дисертацията „Заклучение”, което дава възможност на читателя много точно да се ориентира в разработката и да възприеме постиженията в нея.

Искам със задоволство да подчертая много доброто оформление на дисертацията, коректното отразяване на резултатите в таблици и фигури, както и тяхното професионално представяне. Изводите са логично следствие от експерименталните данни и дават необходимата информация за стойността на проведените изследвания.

В дисертацията се забелязват някои неточности или технически грешки, които съм споделила с докторантката в личен разговор. Те в никакъв случай не се отразяват на стойността на труда. Още повече, че извършените изследвания дават възможност да се открият сериозни теоретични приноси, както оригинални, така и потвърдителни. По същество, те се отнасят до следното:

1. Постигната е целта на дисертационния труд – получени са резултати, които допълват информацията за биотехнологичния потенциал на антарктически филаментозни гъби, разграждащи моно- и полиароматни токсични съединения.

2. Доказано е, че антарктическите гъби проявяват способност за разграждане на фенол и неговите производни при температури под 20°C, което е важно предимство при използването им в природни условия.

3. За първи път е доказан потенциала за разграждане на ароматни съединение от представители на видовете *A. glaucus*, *P. commune* и *A. maritima*.

4. За първи път се съобщава за биодеградацията на ПАХ от антарктически представители на родовете *Aspergillus*, *Penicillium* и *Alternaria*.

5. Получени са оригинални данни за участието на ключови ензими от метаболизма на фенола в разграждане на ароматни и полиароматни съединения от представители на видовете *A. glaucus*, *P. commune* и *A. maritima*.

6. За първи път са секвенирани гени, кодиращи ензими с фенол хидроксилазна и с катехол 1,2-диоксигеназна активност при представител на вид *A. glaucus*.

7. Установени са щамове филаментозни гъби, перспективни за приложение в процесите на деградация на ароматни и полиароматни токсични съединения.

Към докторантката имам следните въпроси:

1. Какво е мястото на биоинженерството в повишаване на катаболитната ефективност на микроорганизмите с потенциал за биоремедиация и може ли това да ускори тяхното приложение?

2. Известна е положителна връзка между наличието на гени, свързани с разграждане на токсични съединения и ефективността на биоремедиацията. Има ли данни за случаи когато гените съществуват, но не се експресират?

Данните, представени в дисертацията са включени в 6 научни труда: 1 статия е отпечатана в списания с IF (Journal of Biotechnology, IF – 2.871), 3 са в реферирани списания и 2 са глави от книги. Стоянова е съавтор на 8 участия в научни форуми (5 международни и 3 национални). Трябва да се отбележи, че в 2 от публикациите и в 3 от участията тя е на първо място, а в 3 статии и 4 участия е на второ място в колектива. Това ми дава основание да считам, че докторантката има решаващо участие в проведените експерименти, а публикуваните резултати са получили международно признание.

В заключение искам да отбележа, че е налице едно добре обмислено научно изследване, осъществено на съвременно методично ниво, с изразен фундаментален характер, но и със сериозно практическо звучене. Под ръководството на научния си ръководител и с помощта на колегите от лабораторията, докторантката Катя Стоянова предлага нова информация за биотехнологичния потенциал на филаментозни гъби от неизследвани екстремни местообитания, за техните предимства при култивиране в условия на ниски температури, както и за участието на ключови ензими от метаболизма на фенола в механизма на разграждане на токсични ароматни съединения. По този начин тя е придобила практически умения и теоретични познания в областта на микробиологията, молекулярната биология и биотехнологията. Получените резултати са достоверни и са солидна база за следващи научни и приложни разработки, открояват се оригинални научни и приложни приноси.

Въз основа на направения разбор и на личните ми впечатления от работата на докторантката през тези години, убедено предлагам на уважаемите членове на научното жури, сформирано със заповед № I-101/21.12.2018 на Директора на ИМикБ, БАН да присъдят на **Катя Цветанова Стоянова образователната и научна степен “доктор” по професионално направление 4.3. Биологични науки (микробиология).**

09. 05. 2019 г

София

Рецензент:.....

/проф. М. Ангелова д.б.н./