

## РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д-р Нели Владова Георгиева, Катедра „Биотехнология“, Химикотехнологичен и металургичен Университет, София

**Относно:** конкурс за заемане на академична длъжност „Доцент“ в професионално направление 4.3. Биологически науки, научна специалност „Микробиология – микробна биодеградация на токсични замърсители на околната среда“ за нуждите на Департамент „Обща Микробиология“, Лаборатория „Микробна генетика“ при Института по Микробиология „Стефан Ангелов“, БАН, публикуван в Държавен вестник бр. №29/12.04.2022 г. с единствен кандидат гл. ас. д-р Мария Гергинова Гергинова.

Настоящата рецензия е изготвена на основание Заповед на Директора на Института по Микробиология-БАН № I-69/30.05.2022 г. и решение на Научното жури от 22.06.2022 г.

За участие в обявения конкурс документи е подала единствено гл. ас. д-р Мария Гергинова Гергинова, понастоящем работеща в същия институт на постоянен трудов договор, Департамент „Обща микробиология“, Лаборатория „Микробна генетика“ с научен стаж 28 години по тематиката на обявения конкурс.

Представените от кандидата документи и материали по конкурса са в съответствие с изискванията на ЗРАСРБ, Правилника за неговото приложение и Правилника за развитие на академичния състав на БАН и отговарят на критериите на Института по Микробиология за заемане на академичната длъжност „Доцент“. Те удовлетворяват и препоръчителните критерии за заемане на академичната длъжност „Доцент“ по ПН 4.3 Биологически науки. Документите по конкурса са структурирани по начин отразяващ много добре академичната дейност на кандидата.

### Професионална биография

Гл. ас. д-р Мария Гергинова Гергинова е родена на 07 октомври 1970 г. в гр. Самоков. През 1988 г. постъпва като редовен студент в БФ на Софийския Университет „Климент Охридски“ и завършва висше образование ОКС Магистър през 1993 г., специалност „Биотехнологични процеси“. След дипломирането си тя постъпва на

работа като специалист в Института по Микробиология „Стефан Ангелов”, БАН, секция „Биосинтез на органични киселини”. През 1996 г. тя преминава в секция „Микробна генетика“ и вече е научен сътрудник. След проведен конкурс от 2011 г. досега тя заема академичната длъжност главен асистент в същата секция. През периода 1999 - 2002 г. тя е докторант в ИМикБ и защитава дисертация за ОНС „Доктор” научна специалност „Микробиология” на тема: „Проучване на процеса на фенолна биодеградация от дрожди *Trichosporon cutaneum* R57.” с научен ръководител доц. д-р Златка Алексиева.

Гл. ас. д-р Гергинова е участник в 12 проекта от които 10 национални проекта (в 1 от тях като ръководител) и един по ОП „Наука и образование за интелигентен растеж“, съфинансиран от Европейския съюз чрез Европейските структурни и инвестиционни фондове, а също така е и официален консултант на две дисертации за ОНС „Доктор“. В изследователската си дейност тя използва богат методологичен арсенал, като наред с добре известни и широко прилагани микробиологични, физиологични и биохимични методи тя владее и едни от най-съвременните подходи за молекулярни и ензимологични анализи.

#### **Основни наукометрични данни, свързани с конкурса**

В настоящия конкурс гл. ас. д-р Мария Гергинова участва с 26 научни публикации след придобиване на ОНС „Доктор“, от които в издания с IF и/или SJR – 18 бр., глави от книги – 8 бр., 4 от тях реферирани и индексирани в Scopus и Web of Science, като общия IF е 23.454, а H- фактора е 9. Разпределението по квартали е следното: в Q1 – 2 публикации, в Q2 – 11 публикации, в Q3 – 3 публикации, в Q4 – 2 публикации. Резултатите от научните разработки са представени на национални и международни научни форуми. Справката за изпълнението на минималните национални изисквания от ЗРАСРБ за научна област 4 и професионално направление 4.3 Биологически науки показва сбор от точки, които изцяло покриват тези критерии, а те са както следва:

Показатели от група А: дисертационен труд 50 т. (мин. 50)

Показатели от група В: хабилитационен труд 100 т. (мин. 100)

Показатели от група Г: научни публикации 239 т. (мин. 220)

Показатели от група Д: цитирания 578 т. (мин. 60)

Цитиранията на публикациите са от световно известни бази данни с научна информация (Web of Science и Scopus) и са представени 289 цитата без автоцитати, при което се събират 578 т. От данните е видно, че научният актив на гл. ас. д-р Мария Гергинова надхвърля минималните национални изисквания, както и допълнителните изисквания на Института по Микробиология, БАН.

### **Анализ на научните приноси**

Представените в конкурса публикувани научни резултати попадат напълно в обсега на обявения конкурс. Научните интереси, отразени в изследователската работа на д-р Мария Гергинова могат да се обобщят в следните области: биодegradация на токсични химични съединения от бактерии, дрожди и филаментозни гъби; определяне и анализ на ензими, участващи в разграждането на ароматни и полиароматни съединения; идентификация на микроорганизми и гени, кодиращи ензими с катаболитна активност свързани с разграждането на ароматни ксенобиотици. Научните приноси на кандидата могат да се обобщят както следва:

#### **1. Биодegradация на токсични химични съединения от бактерии, дрожди и филаментозни гъби**

Научните разработки в тази област са своеобразно продължение на тематиката от дисертационния труд в насока на изследване на дрождевия щам *T. cutaneum* R57 по отношение способността му да разгражда и усвоява широк спектър фенолни съединения, както и нискомолекулни полиароматни съединения, като единствен въглероден и енергиен източник в средата за култивиране. Спектърът на съединения включва: хидроксилирани монофеноли (1.6 g/l резорцинол, 1.3 g/l катехол и 1.2 g/l хидрохинон), метилирани монофеноли (0.1 g/l *m*- и 0.2 g/l *p*- крезол), 0.1 g/l *o*- и 0.1 g/l *m*- нитрофеноли, като **за първи път е установена и деградационната способност на щамата и по отношение на 0.3 г/л нафтаден, антрацен и фенантрен.**

Доказано е биоразграждане на високо токсични промишлени замърсители от нефтопреработващата промишленост, като 0.7 g/l 2,6-динитрофенол, 0.5 g/l  $\alpha$ -метилстирен и 0.5 g/l ацетофенон, които изключително трудно се поддават на биоразграждане. Доказано е и едновременно биоразграждане от *T. cutaneum* R57 на редица бинарни смеси на фенола с негови хлор-, хидрокси-, метил- и нитро-деривати, което е от съществено значение за биоремедиацията на замърсени екосистеми.

Получени са оригинални данни с теоретично и приложно значение за деградацията на фенол и фенолни производни и при щамове филаментозни гъби като *Aspergillus awamori* NRRL3112, притежаващ висока фенол-деградационна активност способен да разгражда катехол, 2,4 дихлорофенол и 2,6 – диметоксифенол и *Trametes versicolor* 1, способен да разгражда 0.5 g/l фенол.

Способност да разграждат фенол в значителни концентрации (от 0.3 до 1 g/l) е доказана и при новоизолирани, антарктически щамове филаментозни фунги. Антарктическите щамове филаментозни фунги са изследвани и за способността им да разграждат хидроксилирани и метилирани деривати на фенола и полиароматни вещества при 23°C (мезофилни условия) и 10°C (психротрофни условия).

За първи път е установена деградационна активност по отношение на ароматни съединения на представител на вид *Aspergillus glaucus* AL1, усвояващ фенол, катехол, хидрохинон, *o*-, *m*-, *p*-крезол и е способен да разгради частично 0.3 g/l нафтаден и антрацен. Доказано е, че щам *A. fumigatus* AL3 притежава висока деградационна способност и усвояване по отношение на катехол, *o*- крезол, може да расте в среда, съдържаща фенол, хидрохинон или *m* -крезол до пълното им изчерпване, както и да осъществява частична деградация на нафтаден и антрацен в мезофилни условия. Установено е, че щам *A. fumigatus* AL15 е най-активният деградант на *o*-крезол и усвоява 0.3 g/l фенол и катехол както при 23°C, така и при 10°C.

За първи път е установена деградационна активност по отношение на ароматни съединения при *Alternaria maritima* AL10 - усвояване на катехол и използване на ПАВ като единствени въглеродни и енергийни източници

Установени са с GC-MS анализи междинните продукти в разграждането на нафтаден от *A. glaucus* AL1 - салицилова киселина, катехол и кетoadипинова киселина. Междинните продукти идентифицирани при катаболизма на антрацена са: 2-хидрокси-1-нафтоена киселина, *o*-фталова киселина и протокатехинова киселина.

Доказана е висока деградационна активност при изследваните филаментозни гъби по отношение на фенола, фенолните деривати, и нискомолекулярните ПАВ – нафтаден, антрацен и фенантрен, включени в културалната среда като единствен източник на въглерод и енергия.

Доказана е също висока деградационна активност по отношение на фенол и при бактериални щамове *Rhodococcus erythropolis* 14/1 и *Gordonia* sp. 12/5, изолати от района на Кумкол, област Кизилорда в Казахстан.

Създадени са биокинетични модели тип *Haldane* с най-добро съответствие за скоростите на разграждане на фенол, хидроксисти заместени феноли и токсичните ароматни съединения 2,6-динитрофенол,  $\alpha$ -метилстирен и ацетофенон. Предложена е стратегия за управление на деградацията на токсични съединения, базирана на размит модел (Fuzzy), като по този начин се подобрява ефективността на управление на процесите, спестява се време и наблюдението на процеса е по-рентабилно.

## **2. Анализ на ензими, пряко участващи в деградацията на ароматни и полиароматни съединения**

Получени са оригинални данни за присъствието на ключови ензими (фенол хидроксилаза и катехол 1,2 - диоксигеназа) от *ortho*-механизма на 3-оксоадипатния път за усвояване на фенолните съединения при представители дрожди и филаментозни гъби. Доказана е широката субстратна специфичност на ензима фенол хидроксилаза [EC 1.14.13.7] в клетки на шам *T. cutaneum* R57, култивиран в среда с фенол (0.5 g/l), като най-висока фенол хидроксилазна активност е установена при субстрат хидрохинон – 1.2 U/mg P.

Доказано е при шам *A. glaucus* AL1 субстратна специфичност на ензимите фенол хидроксилаза и катехол 1,2-диоксигеназа, като при използване на фенол, активността на фенол хидроксилазата е най-висока (0.254 U/mg P), докато при експериментите с хидрохинон или катехол, активността на ензима е съответно 0.125 U/mg P и 0.179 U/mg P. Активността на катехол 1,2-диоксигеназата е най-висока при разграждане на фенол или катехол, докато при разграждането на хидрохинон, *o*-, *m*-, *p*- крезол съществено намалява.

За първи път при фунги е установено наличието на висока фенол хидроксилазна активност при култивирането на шам *A. glaucus* AL1, в среда, включваща нафтаден и антрацен, като единствен източник на въглерод. Най-висока фенол хидроксилазна активност (1.48 U/mg P) е установена в клетки на шам *A. glaucus* AL1, култивиран в среда, съдържаща нафтаден, като единствен въглероден субстрат. Висока фенол хидроксилазна активност е установена и при култивиране на шам *Alternaria maritima* AL10 в среда, съдържаща 0.3 г/л антрацен или фенантрен. При шам *A. fumigatus* AL15

е доказана най-високата катехол 1,2-диоксигеназна активност при култивирането му в среда, включваща катехол.

Доказана е способността на щамове филаментозни гъби *A. fumigatus* (AMA1102, AL8, AL9) за разграждане на фенол едновременно по два основни механизми. Класическият път на *ortho*-разцепване е през катехол, но съществува и втори успореден път, при който фенолът се превръща чрез хидроксилиране в *para*-позиция в хидрохинон. Хидрохинонът допълнително се хидроксилира от ензима хидрохинон хидроксилаза. Определени са активностите на три вътреклетъчните ключови ензима, участващи в катаболизма на фенола - фенол хидроксилаза, хидрохинон хидроксилаза [ЕС 1.14.13.x] и катехол 1,2-диоксигеназа [ЕС 1.13.11.1], които варират значително между щамовете от един и същи вид. Получените резултати потвърждават тезата, че флавопротеиновите моно-оксигенази са много адаптивни по отношение на типа реакции на окисление, които катализират и към обхвата на субстратните молекули.

Доказана е висока активност на фенол хидроксилазата при лигнолитичната гъба, *T. versicolor* 1, представител на Basidiomycota - 0.333 U/mgP. При този представител е доказан и третия ензим от *ortho*- катаболитния път на разграждане – *cis,cis*-муконат циклаза с активност 0.409 U/mgP.

Получени са оригинални данни от ензимния анализ на изследваните микробни щамове, които съчетани с растежните и биодеградационни характеристики показват много висок деградационен потенциал по отношение отстраняването на широк спектър ароматни субстрати в мезофилни условия, а при някои от тях и при 10°C. Експериментално е доказано отсъствието на екстрацелуларна лаказна активност при изследваните щамове, с изключение на *T. versicolor* 1, което означава, че установената при тях деградация на ароматните съединения се дължи изключително на действието на вътреклетъчните ензими, участващи във вътреклетъчния катаболизъм на фенола.

### **3. Идентификация на микроорганизми и гени, кодиращи ензими с катаболитна активност при разграждането на ароматни ксенобиотици**

Извършен е молекулярно таксономичен анализ на 21 бактериални и 2 плесенни щама и получените олигонуклеотидни секвенции са регистрирани в NCBI GeneBank при следните щамове: *Arthrobacter* sp.(MF188995.1), *Dietzia* sp. (12/7MF188990.1), *Dietzia* sp. 13/4 (MF188991.1), *Gordonia* sp. 12/5 (MF188989.1), *Rhodococcus erythropolis* 14/1 (MF188993.1), *Rh.* sp. 1D/1 (MF188988.1), *Rh.* sp. 14/3 (MF188994.1), *Tessaracoccus*

sp. 13/8 (MF188992.1), *Aeromonas* sp. (MH394445.1), *Azoarcus* sp. RS4 (MH394448.1), *Clostridium* sp. 4C (MH394443.1), *Burkholderia* sp. phk1 (EU118563.1), *Bacillus* sp. AM3 (MF996775.1), *Porphyromonadaceae bacterium* 3S (MH394442.1), *Pseudomonas* sp. KM1 (MG002174.1), *Ps.* sp. 2C (MH394441.1), *Ps.* sp. 4S (MH394444.1), *Ps.* sp. RS2 (MH394446.1), *Ps.* sp. RS3 (MH394447.1), *Ps.* sp. RS5 (MH394449.1), *Ps.* sp. RS6 (MH394450.1); и плесенни щамове: *A. fumigatus* strain AL9 (JQ639072.1), *A. fumigatus* AL3 (KT781127.1).

Създадени са оригинални олигонуклеотидни праймери, подходящи за PCR амплификация на гени, кодиращи ензими с фенол хидроксилазна и катехол 1,2 диоксигеназна активност при филаментозни гъби. Идентифицирани и частично секвенирани са гени, кодиращи протеини с фенол хидроксилазна активност в щамове *A. glaucus* AL1 (KM360482.1), *A. fumigatus* AL3 (KT781125.1), *A. fumigatus* AL8 (JQ639073.1), *A. fumigatus* AL9 (JQ639074.1) и *A. fumigatus* AL15 (KT371934.1).

За първи път са секвенирани гени, кодиращи ензими с катехол 1,2-диоксигеназна активност при щамове *A. glaucus* AL1 (KM360483.1), *A. fumigatus* AL3 (KT781126.1), *A. fumigatus* AL9 (MK598849.1) и *A. glaucus* AL15 (KT371935.1).

Доказано е наличието на ДНК-фрагменти сходни на гени кодиращи ензимите фенол хидроксилаза и *цис*, *цис* – муконат циклаза в различни изследвани щамове способни да деградират ароматни съединения по *ortho*-механизъм с помощта на dot blot хибридизационен анализ. Създадената олигонуклеотидна сонда “OligoZA1” за хибридизационен анализ на гени, кодиращи протеини с *цис*, *цис* – муконат циклазна активност при микроорганизми е с оригинален характер.

## **Закючение**

Включените за оценка в този конкурс научни разработки се отличават с оригиналност, акуратност и актуалност и като изцяло съответстват на научната област и научно направление на настоящия конкурс. Получените резултати и научните приноси на гл.ас. д-р Мария Гергинова, отразяващи дългогодишния ѝ изследователски опит, разкриват възможности и перспектива за нови изследвания по актуални проблеми. Добро впечатление прави и начертаните аспекти за бъдеща работа, продължение на разработваната тематика. Всички формални изисквания, посочени в Закона за развитие на академичния състав в Република България, както и Правилника

за неговото приложение са изпълнени като наукометричните данни на гл. ас. д-р Мария Гергинова надвишават минималните национални и допълнителни изисквания на ЗРАСРБ и съответния правилник на ИМикБ за заемане на академичната длъжност „Доцент“ в ПН 4.3 Биологически науки. Представени са достатъчно убедителни доказателства за научна дейност и анализът на научните резултати ми дават основание да дам **положителна оценка** на единствения кандидат в конкурса **гл. ас. д-р Мария Гергинова Гергинова**. Убедено препоръчвам на Научното жури и на Научния съвет на Института по микробиология, БАН да избере **гл. ас. д-р Мария Гергинова** за Доцент в ПН 4.3 Биологически науки, научна специалност „Микробиология – микробна биодegradация на токсични замърсители на околната среда”.

15.07.2022 г.

Член на журито:

/проф. д-р Нели Георгиева/