

**Резюмета на научни публикации на английски и български,
съгласно минималните национални критерии по ЗРАСРБ и
допълнителните изисквания на ИМикБ-БАН
на гл. ас. д-р Мария Гергинова за участие в конкурс за доцент**

по направление 4.3. Биологически науки, Микробиология - микробна биодеградация на токсични замърсители на околната среда за нуждите на Департамент „Обща Микробиология”, Лаборатория Микробна генетика

Публикации по Група от показатели В на ППЗРАСРБ

1. Alexieva Z., **Gerginova M.**, Zlateva P., Peneva N. Comparison of growth kinetics and phenol metabolizing enzymes of *Trichosporon cutaneum* R57 and mutants with modified degradation abilities. (2004) *Enzyme and Microbial Technology*, 34 (3-4), 242-247.

Abstract:

The model kinetic coefficients of the growth and phenol degradation processes of *Trichosporon cutaneum* R57 strain and the investigated mutants in culture media containing phenol as a sole carbon and energy source are reported. Successfully simulated phenol degradation profiles in all studied strains were obtained by Haldane-type kinetics. The data presented in the paper showed no direct correlation between efficiency of phenol degradation by the strains studied and biomass productivity. The observed significant increase of inhibitory coefficients in both 2R ($k_i=0.46 \text{ g l}^{-1}$) and 4R ($k_i = 0.44 \text{ g l}^{-1}$) mutants corresponded with their improved capacity to degrade phenol and increased phenol hydroxylase activity. The intracellular specific activities of phenol hydroxylase [EC 1.14.13.7] and catechol 1,2-dioxygenase [EC 1.13.11.1] in *T. cutaneum* R57 strain and its mutants are measured. The comparison of data for phenol hydroxylase and catechol 1,2-dioxygenase activities in cell-free extracts obtained by ultrasonication and in permeabilized cells showed that the method of cell permeabilization was more favorable for enzyme analyses. The obtained specific activity of phenol hydroxylase in *T. cutaneum* R57 was 0.8 U mg^{-1} protein while those in 2R and 4R mutant strains were 1.47 U mg^{-1} protein and 1.28 U mg^{-1} protein, respectively. The value of catechol 1,2-dioxygenase activity showed quite less variability and was kept about 0.2 U mg^{-1} protein in all investigated strains. The results received in these experiments demonstrated that the increased rate of the initial phenol degradation reaction enhanced phenol utilization by cells and vice versa.

Резюме:

Представени са кинетичните коефициенти на процесите на растеж и разграждане на фенол на щам *Trichosporon cutaneum* R57 и изследвани мутанти в хранителна среда, съдържаща фенол като единствен въглероден и енергиен източник. С кинетичен модел тип Haldane успешно са симулирани профилите на разграждане на фенол при всички изследвани щамове. Данните, представени в статията, не показват пряка връзка между ефективността

на разграждането на фенола от изследваните щамове и натрупването на биомаса. Наблюдаваното значително увеличение на инхибиторните коефициенти при мутантите 2R ($k_i = 0.46 \text{ g l}^{-1}$) и 4R ($k_i = 0.44 \text{ g l}^{-1}$) съответства на повишеният им капацитет за разграждане на фенол и повишената активност на ензима фенол хидроксилаза. Определена е вътреклетъчната специфични активности на ензимите фенол хидроксилаза [ЕС 1.14.13.7] и катехол 1,2-диоксигеназа [ЕС 1.13.11.1] в щам *T. cutaneum* R57 и неговите мутанти. Сравняването на данните за активността на ензимите фенол хидроксилаза и катехол 1,2-диоксигеназа в безклетъчни екстракти, получени чрез разрушаване с ултразвук и в пермеабилizирани клетки, показва, че методът на клетъчна пермеабилзация е по-благоприятен за определяне на ензимната активност. Получената специфична активност на ензима фенол хидроксилаза в *T. cutaneum* R57 е 0.8 U/mgP , докато тези в 2R и 4R мутантни щамове са съответно 1.47 U/mgP и 1.28 U/mgP . Стойността на катехол 1,2-диоксигеназната активност показва доста по-малка вариабилност и е около 0.2 U/mP при всички изследвани щамове. Резултатите, получени в тези експерименти, демонстрират, че повишената скорост при началната реакция на разграждане на фенол подобрява деградацията на фенола от клетките и обратно.

2. Gerginova M., Manasiev J., Shivarova N., Alexieva Z. Influence of various phenolic compounds on phenol hydroxylase activity of a *Trichosporon cutaneum* strain. (2007) *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 62 (1-2), 83-86.

Abstract:

The phenol-degrading strain *Trichosporon cutaneum* R57 utilizes various aromatic and aliphatic compounds as a sole carbon and energy source. The intracellular activities of phenol hydroxylase [ЕС 1.14.13.7] of a *Trichosporon cutaneum* R57 strain grown on phenol (0.5 g/l) were measured. Different toxic phenol derivatives (cresols, nitrophenols and hydroxyphenols) were used as substrates in the reaction mixture for determination of the enzyme activity. The data obtained showed that the investigated enzyme was capable to hydroxylate all applied aromatic substrates. The measured activities of phenol hydroxylase varied significantly depending on the aromatic compounds used as substrates. The rate of phenol hydroxylase activity with phenol as a substrate (1.0 U/mg total cell protein) was accepted as 100%.

Резюме:

Фенол разграждащият щам *Trichosporon cutaneum* R57 е способен да усвоява различни ароматни и алифатни съединения като единствен въглероден и енергиен източник. Установена е активността на вътреклетъчният ензим фенол хидроксилаза [ЕС 1.14.13.7] при щам *Trichosporon cutaneum* R57, култивиран в среда с фенол (0.5 g/l). За определяне на ензимната активност като субстрати в реакционната смес са използвани различни токсични фенолни производни (крезоли, нитрофеноли и хидроксифеноли). Получените данни показват, че изследвания ензим е способен да хидроксилира всички използвани субстрати. Установените активности на ензима фенол хидроксилаза варират значително в зависимост от ароматните съединения, използвани като субстрати. Активността на фенол

хидроксилазата с фенол като субстрат (1.0 U/mg общ клетъчен протеин) се приема за 100%.

3. Alexieva Z., Gerginova M., Zlateva P., Manasiev J., Ivanova D., Dimova N. Monitoring of aromatic pollutants biodegradation. (2008) *Biochemical Engineering Journal*, 40 (2), 233-240.

Abstract:

Trichosporon cutaneum R57 is known as effective biodegradant able to utilize and thus remove a number of toxic aromatic compounds from the environment. In the present study, the dynamics of the processes of degradation of monohydroxyl derivatives of phenol (resorcinol, catechol and hydroquinone) in concentrations up to 1.6 g/l were investigated and inhibitory constants (k_i) of these compounds were determined 0.58, 0.55, and 0.6 g/l correspondingly. The biodegradation of significantly more toxic aromatic compounds 2,6-dinitrophenol ($k_i = 0.13$ g/l), α -methylstyrene ($k_i = 0.25$ g/l) and acetophenone ($k_i = 0.15$ g/l) was also described. Based on summarized qualitative and quantitative data and the “if-then” rules developed, a fuzzy model was designed to describe the processes despite the degree of toxicity and concentration of the aromatic compounds. The output linguistic variables “normal”, “check” and “attention” were defined, which determine further measures for improvement of process quality. The model suggested provides opportunity for early estimation of the biodegradation process quality.

Резюме:

Щам *Trichosporon cutaneum* R57 е ефективен биодеградант, способен да усвоява редица токсични ароматни съединения и по този начин да ги елиминира от околната среда. В настоящото изследване е проследена динамиката на процесите на деградация на монохидроксилните производни на фенола (резорцинол, катехол и хидрохинон) в концентрации до 1.6 g/l и са определени инхибиторните константи (k_i) на тези съединения съответно: 0.58, 0.55 и 0.6 g/l. Описано е също биоразграждането на значително по-токсичните ароматни съединения 2,6-динитрофенол ($k_i = 0.13$ g/l), α -метилстирен ($k_i = 0.25$ g/l) и ацетофенон ($k_i = 0.15$ g/l). Въз основа на обобщени качествени и количествени данни, и разработените правила „ако-тогава“, беше създаден размит модел, който да опише процесите на деградация независимо от степента на токсичност и концентрацията на ароматните съединения. Дефинирани бяха изходни променливи „нормално“, „проверка“ и „внимание“, които насочват към следващи решения за подобряване на качеството на процеса. Предложеният модел предоставя възможност за ранна оценка на процеса на биодеградация.

4. Gerginova M., Manasiev J., Yemendzhiev H., Terziyska A., Peneva N., Alexieva Z. Biodegradation of phenol by Antarctic strains of *Aspergillus fumigates*. (2013) *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 68 C (9-10), 384-393.

Abstract:

Taxonomic identification of three newly isolated Antarctic fungal strains by their 18S rDNA sequences revealed their affiliation with *Aspergillus fumigatus*. Phenol (0.5 g/l) as the sole carbon source was completely degraded by all strains within less than two weeks. Intracellular activities of three key enzymes involved in the phenol catabolism were determined. Activities of phenol hydroxylase [EC 1.14.13.7], hydroquinone hydroxylase (EC 1.14.13.x), and catechol 1,2-dioxygenase [EC 1.13.11.1] varied significantly between strains. The rates of phenol degradation in the three strains correlated best with the activity of catechol 1,2-dioxygenase.

Six pairs of oligonucleotide primers were designed on the basis of the *Aspergillus fumigatus* Af293 genome sequence (NCBI Acc. No. XM_743491.1) and used to amplify phenol hydroxylase-related gene sequences. DNA sequences of about 1200 bp were amplified from all three strains and found to have a high degree of sequence identity with the corresponding gene of *Aspergillus fumigatus* Af293.

Резюме:

Три новоизолирани, антарктически щама филamentosни гъби, са таксономично идентифицирани на базата на 18S rDNA последователности като принадлежащи към вида *Aspergillus fumigatus*. Всички щамове напълно разграждат фенол (0.5 g/l) като единствен източник на въглерод за по-малко от две седмици. Определени са активностите на три вътреклетъчните ключови ензима, участващи в катаболизма на фенола. Активностите на фенол хидроксилаза [EC 1.14.13.7], хидрохинон хидроксилаза [EC 1.14.13.x] и катехол 1,2-диоксигеназа [EC 1.13.11.1] варират значително между щамовете. Скоростта на разграждане на фенола в трите щама корелира най-добре с активността на катехол 1,2-диоксигеназата.

На базата на геномна последователност на *Aspergillus fumigatus* Af293 (NCBI Acc. No. XM_743491.1) бяха създадени шест двойки олигонуклеотидни праймери, които са използвани за амплификация на генни последователности, свързани с ензима фенол хидроксилаза. При трите щама бяха амплифицирани ДНК последователности от около 1200 bp и беше установено, че секвенциите имат висока степен на идентичност със съответния ген на *Aspergillus fumigatus* Af293.

5. Stoyanova K., **Gerginova M.**, Dincheva I., Peneva N., Alexieva Z. Biodegradation of naphthalene and anthracene by *Aspergillus glaucus* strain isolated from Antarctic soil. (2022) *Processes*, 10 (5), art. no. 873

Abstract:

Biotechnologies based on microbial species capable of destroying harmful pollutants are a successful way to solve some of the most important problems associated with a clean environment. The subject of investigation is the Antarctic fungal strain *Aspergillus glaucus* AL1. The culturing of the examined strain was performed with 70 mg of wet mycelium being inoculated in a Czapek Dox liquid medium containing naphthalene, anthracene, or phenanthrene (0.3 g/l) as the sole carbon source. Progressively decreasing naphthalene and anthracene

concentrations were monitored in the culture medium until the 15th day of the cultivation of *A. glaucus* AL1. The degradation was determined through gas chromatography–mass spectrometry. Both decreased by 66% and 44%, respectively, for this period. The GC-MS analyses were applied to identify salicylic acid, catechol, and ketoadipic acid as intermediates in the naphthalene degradation. The intermediates identified in anthracene catabolism are 2-hydroxy-1-naphthoic acid, o-phthalic acid, and protocatechuic acid. The enzyme activities for phenol 2-monooxygenase [1.14.13.7] and catechol 1,2-dioxygenase [1.13.11.1] were established. A gene encoding an enzyme with catechol 1,2-dioxygenase activity was identified and sequenced (GeneBank Ac. No KM360483). The recent study provides original data on the potential of an ascomycete's fungal strain *A. glaucus* strain AL 1 to degrade naphthalene and anthracene.

Резюме:

Биотехнологиите, базирани на микробни видове, способни да разграждат токсични замърсители, са успешен начин за решаване на някои от най-важните проблеми, свързани с чистата околна среда. Обект на изследване е антарктическият щам *Aspergillus glaucus* AL1. Култивирането на изследвания щам се извършва със 70 mg мицел, инокулиран в течна среда Чапек Докс, съдържаща нафтаген, антрацен или фенантрен (0.3 g/l) като единствен източник на въглерод. Наблюдава се прогресивно намаляване на концентрациите на нафтаген и антрацен в хранителната среда до 15-ия ден от култивирането на *A. glaucus* AL1. Разграждането е установено чрез газхроматографски – маспектрометричен анализ. И двете съединения намаляват съответно с 66% и 44% в рамките този период. GC-MS анализите бяха приложени за идентифициране на салицилова киселина, катехол и кетoadипинова киселина като междинни продукти в разграждането на нафтагена. Междинните продукти идентифицирани при катаболизма на антрацена са: 2-хидрокси-1-нафтоена киселина, о-фталова киселина и протокатехуинова киселина. Установени са ензимните активности за фенол 2-монооксигеназа [1.14.13.7] и катехол 1,2-диоксигеназа [1.13.11.1]. Беше идентифициран и секвениран ген, кодиращ ензим с катехол 1,2-диоксигеназна активност (GeneBank Ac. No KM360483). Проучването представя оригинални данни за потенциала на аскомицетен щам *A. glaucus* щам AL1, да разгражда нафтаген и антрацен.

Публикации по Група от показатели Г на ППЗРАСРБ

6. Kaimaktchiev A., Denchev D., **Gerginova M.**, Alexieva Z., The effect of Cu²⁺ and Cd²⁺ on citric acid production by *Saccharomycopsis lipolytica* strains. (1998) *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 12 (1), 56-62.

Abstract:

The influence of copper and cadmium on the microbial growth and production was assessed in conjunction with three *Saccharomycopsis lipolytica* strains, which are used particularly as citric acid producers. Stable metal resistant mutants were obtained. The main kinetic parameters

specific growth rate and specific rate of product formation of the mutant strains were determined and compared to these of the wild type.

Резюме:

Изследвано е влиянието на мед и кадмий върху растежа и продуктивността на три щама *Saccharomycopsis lipolytica*, продуценти на лимонена киселина. Получени са стабилни мутанти, устойчиви на метали. Основните кинетични параметри, специфична скорост на растеж и специфична скорост на продуктообразуване бяха определени при мутантите и сравнени с тези при дивия щам.

7. Stoilova I., Krastanov A., Stanchev V., Daniel D., **Gerginova M.**, Alexieva Z. Biodegradation of high amounts of phenol, catechol, 2,4-dichlorophenol and 2,6-dimethoxyphenol by *Aspergillus awamori* cells. (2006) *Enzyme and Microbial Technology*, 39 (5), 1036-1041.

Abstract:

The mycelium (or conidia) of *Aspergillus awamori* NRRL 3112 was investigated for its ability to degrade phenol, catechol, 2,4-dichlorophenol and 2,6-dimethoxyphenol in high concentrations. The biodegradation studies were performed in a liquid medium with the phenolic compounds as a sole carbon and energy source. The organism had mineralized phenol concentration of 0.3 g/l in 60 h, 0.6 g/l in 72 h and 1.0 g/l in 7–8 days. *A. awamori* had fully degraded catechol concentration of 1.0 g/l in 82 h, 2.0 g/l in 108 h and 3.0 g/l in 124 h. Five days are sufficient for complete biodegradation of 1.0 and 2.0 g/l 2,4-dichlorophenol. The higher concentration of 3.0 g/l was degraded at a rate of 85% for 6 days. The degradation of 2,6-dimethoxyphenol goes slow and only 1.0 g/l concentration was fully degraded for 7 days. In case of 2.0 and 3.0 g/l no complete degradation can be observed even after 8 days of the process. Successfully simulated phenols degradation profiles in all studies were obtained by Haldane-type kinetics. The values of endogenous or decay and yield coefficients for all phenols at different concentrations were also determined.

Резюме:

Мицел (или конидии) на *Aspergillus awamori* NRRL 3112 беше изследван за способността му да разгражда високи концентрации фенол, катехол, 2,4-дихлорфенол и 2,6-диметоксифенол. Изследванията на процеса на биодegradация са проведени в течна среда с фенолните съединения като единствен въглероден и енергиен източник. Микроорганизмът разгражда фенола в концентрация 0.3 g/l за 60 часа, 0.6 g/l за 72 часа и 1.0 g/l за 7–8 дни. *A. awamori* напълно разгражда катехол от концентрация 1.0 g/l за 82 часа, 2.0 g/l за 108 часа и 3.0 g/l за 124 часа. Пет дни са достатъчни за пълно разграждане на 1.0 g/l и 2.0 g/l 2,4-дихлорфенол. По-високата концентрация от 3.0 g/l се разгражда до 85% за 6 дни. Разграждането на 2,6-диметоксифенол става бавно и концентрацията от 1.0 g/l се разгражда напълно за 7 дни. При 2.0 g/l и 3.0 g/l не се наблюдава пълно разграждане дори след 8-мия ден от процеса. Получени са успешно симулирани профили на разграждане при

всички фенолни съединения чрез кинетичен модел от типа Haldane. Бяха определени стойностите на кинетичните параметри на всички изследвани фенолни съединения при различни концентрации.

8. Alexieva Z., Gerginova M., Manasiev J., Zlateva P., Shivarova N., Krastanov A. Phenol and cresol mixture degradation by the yeast *Trichosporon cutaneum*. (2008) *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35 (11), 1297-1301.

Abstract:

Most industrial wastes contain different organic mixtures, making important the investigation on the microbial destruction of composite substrates. The capability of microbes to remove harmful chemicals from polluted environments strongly depends on the presence of other carbon and energy substrates. The effect of mixtures of phenol and methyl-substituted phenols (*o*-, *m*-, *p*-cresol) on the growth behaviour and degradation capacity of *Trichosporon cutaneum* strain was investigated. The cell-free supernatants were analysed by HPLC. It was established that the presence of *o*-, *m*- and *p*-cresol has not prevented complete phenol assimilation but had significant delaying effect on the phenol degradation dynamics. The mutual influence of phenol and *p*-cresol was investigated. We developed the kinetic model on the basis of Haldane kinetics, which used model parameters from single-substrate experiments to predict the outcome of the two substrate mixture experiment. The Interaction coefficients indicating the degree to which phenol affects the biodegradation of *p*-cresol and vice versa were estimated. Quantitative estimation of interaction parameters is essential to facilitate the application of single or mixed cultures to the bio-treatment of hazardous compounds.

Резюме:

Повечето промишлени отпадъци съдържат различни органични смеси, което прави важно изследването на микробното разграждане на смеси от субстрати. Способността на микробите да отстраняват вредни химикали от замърсена среда силно зависи от наличието и на други въглеродни и енергийни субстрати в средата за развитие. Изследван е ефектът на смеси от фенол и метил-заместени феноли (*o*-, *m*-, *p*-крезоли) върху растежа и деградационните възможности на щама *Trichosporon cutaneum*. Супернатантите са анализирани чрез HPLC. Установено е, че наличието на *o*-, *m*- и *p*-крезол не възпрепятства пълната деградация на фенола, но има значителен забавящ ефект върху динамиката на разграждането на фенола. Изследвано е взаимното влияние на фенол и *p*-крезол. Разработен е кинетичен модел, който използва параметри от експерименти с един субстрат (тип Haldane), за да опише резултат от експеримент на смес от два субстрата. Изведени са коефициенти на взаимодействие, показващи степента, до която фенолът влияе върху биоразграждането на *p*-крезол и обратно. Количествената оценка на параметрите на взаимодействие е от съществено значение при биоразграждане на токсични съединения влючени като единични или смесени субстрати.

9. Yemendzhiev H., Gerginova M., Krastanov A., Stoilova I., Alexieva Z., Growth of *Trametes versicolor* on phenol. (2008) *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35 (11), 1309-1312.

Abstract:

Trametes versicolor 1 was shown to grow on phenol as its sole carbon and energy source. The culture growth and degradation ability dependence on culture medium pH value was observed. The optimal pH value of a liquid Czapek salt medium was 6.5. The investigated strain utilized completely 0.5 g/l phenol in 6 days. The dynamics of the phenol degradation process was investigated. The process was characterized by specific growth rate μ_{\max} 0.33 h⁻¹, metabolic coefficient $k = 4.4$, yield coefficient $Y_{x/s} = 0.23$ and rate of degradation $Q = 0.506$ h⁻¹. The intracellular activities of phenol hydroxylase (0.333 U/mg protein) and *cis,cis*-muconate lactonizing enzyme (0.41 U/mg protein) were demonstrated for the first time in this fungus. In an attempt to estimate the occurrence of gene sequences in *T. versicolor* 1 related to phenol degradation pathway a dot blot analysis with total DNA isolated from this strain was performed. Two synthetic oligonucleotides were used as hybridizing probes. One of the probes was homologous to the 5' end of *phyA* gene coding for phenol hydroxylase in *Trichosporon cutaneum* ATCC 46490. The other probe was created on the basis of *cis,cis*-muconate lactonizing enzyme coding gene in *T. cutaneum* ATCC 58094. The results of these investigations showed that *T. versicolor* 1 may carry genes similar to those of *Trichosporon cutaneum* capable to degrade phenol.

Резюме:

Доказано е, че *Trametes versicolor* 1 расте на фенол като единствен въглерод и енергиен източник. Наблюдава се зависимост между растежа и способността за деградация и рН стойността на културалната среда. Оптималната стойност на рН на течна минерална среда Чапек Докс е 6.5. Изследваният щам усвоява напълно 0.5 g/l фенол за 6 дни. Изследвана е динамиката на процеса на разграждане на фенола. Процесът се характеризира със специфична скорост на растеж μ_{\max} 0.33 h⁻¹, метаболитен коефициент $k = 4.4$, добивен коефициент $Y_{x/s} = 0.23$ и скорост на разграждане $Q = 0.506$ h⁻¹. За първи път в тази гъбичка бяха установени активности на вътреклетъчните ензими фенол хидроксилаза (0.333 U/mg P) и *цис,цис*-муконат лактонизиращ ензим (0.41 U/mgP). В опит да се оцени наличието на генни последователности свързани с пътя на разграждане на фенола, беше извършен Дот блот анализ с геномна ДНК, изолирана от щам *T. versicolor* 1. Бяха използвани два синтетични олигонуклеотида като хибридиращи сонди. Една от сондите е хомоложна на 5' края на *phyA* гена, кодиращ фенол хидроксилаза в *Trichosporon cutaneum* ATCC 46490. Другата сонда е създадена на базата на *цис,цис*-муконатен лактонизиращ ензим, кодиращ ген в *T. cutaneum* ATCC 58094. Резултатите от тези изследвания показват, че *T. versicolor* 1 може да носи гени, подобни на тези при фенол разграждащия щам *Trichosporon cutaneum*.

10. Manasiev J., **Gerginova M.**, Yemendzhiev H., Peneva N., Alexieva Z. Molecular analysis of phenol-degrading microbial strains. (2008) *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 63 (1-2), 133-138.

Abstract:

In an attempt to estimate the occurrence of phenol hydroxylase-related gene sequences we performed a dot blot hybridization assay with DNA from phenol utilizing *Trichosporon cutaneum* R57 strain NBIMCC 2414 and microbial isolates from different wastewaters. The used oligonucleotides were homologous to the 5'-end of TORPHD locus (NCBI)-coding phenol hydroxylase in *Trichosporon cutaneum* ATCC 46490 and to the 5'-end of TORCCMLE locus (NCBI)-coding *cis,cis*-muconate-lactonizing enzyme in *Trichosporon cutaneum* ATCC 58094. Two microbial strains, *Escherichia coli* JM 109 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, incapable to degrade phenol were used as negative controls. We established the presence of hybridization with both used oligonucleotide probes in *T. cutaneum* R57 and *T. cutaneum* ATCC 46490 yeast strains. The experiments implemented with microbial isolates obtained from three industrialized areas in Bulgaria showed that 7 of them may carry sequences hybridizing with a phenol hydroxylase oligonucleotide probe. A subsequent hybridization test for the *cis,cis*-muconate-lactonizing enzyme showed that only 3 of them displayed a positive signal. *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 and *Escherichia coli* JM 109 strains' DNA used as negative controls in the experiments did not reveal any sequence similarity to the both applied oligonucleotides. The partial nucleotide sequences of 16S rDNAs of the isolated strains C1 and K1 obtained as PCR products were determined and sequenced. A comparison of these nucleotide sequences with similar sequences in NCBI Data Bank indicated that both C1 and K1 strains are closely related to the genera *Acinetobacter* and *Burkholderia*.

Резюме:

В опит да оценим появата на генни последователности, свързани с ензима фенол хидроксилаза, проведохме дот блот хибридизационен анализ с ДНК от фенол деградацията щам *Trichosporon cutaneum* R57 NBIMCC 2414 и микробни изолати от различни отпадни води. Използваните олигонуклеотиди са хомоложни на 5'-края на TORPHD locus (NCBI) кодиращ фенол хидроксилаза в *Trichosporon cutaneum* ATCC 46490 и на 5'-края на TORCCMLE locus (NCBI) кодиращ *cis, cis*-муконат, ензим в *Trichosporon cutaneum* ATCC 58094. Като отрицателни контроли бяха използвани два микробни щамове, *Escherichia coli* JM 109 и *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, неспособни да разграждат фенол. Установихме наличието на хибридизация с двете използвани олигонуклеотидни сонди в щамове дрожди *T. cutaneum* R57 и *T. cutaneum* ATCC 46490. Експериментите, проведени с микробни изолати, получени от три индустриализирани района в България, показаха, че 7 от тях могат да носят последователности, хибридиращи се с фенолхидроксилазната олигонуклеотидна сонда. Следващият хибридизационен тест за *cis,cis*-муконат-лактонизиращия ензим показа, че само 3 от тях показват положителен сигнал. ДНК на щамове *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 и *Escherichia coli* JM 109, използвани като отрицателни контроли в експериментите, не разкрива никакво сходство с

двете приложени олигонуклеотидни сонди. Частичните нуклеотидни последователности на 16S rDNAs на изолираните щамове C1 и K1, получени като PCR продукти бяха секвенирани. Сравнението на тези нуклеотидни последователности с подобни последователности в NCBI Data Bank показва, че двата щама C1 и K1 са тясно родствено свързани с родовете *Acinetobacter* и *Burkholderia*.

11. Yemendzhiev H., Gerginova M., Terziyska A., Alexieva Z. Biochemical and genetic studies of phenol biodegradation by *Aspergillus awamori* strain. (2009) *Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences*, 62 (9), 1089-1094.

Abstract:

Aspergillus awamori NRRL 3112 was shown to grow on phenol as a sole carbon and energy source. The intracellular enzyme activities of phenol hydroxylase (0.1 U/mg protein), catechol 1,2 dioxygenase (0.18 U/mg protein) and *cis,cis*-muconate lactonizing enzyme (0.19 U/mg protein) were established. DNA hybridization analyses were performed in an attempt to establish the occurrence of gene sequences related to phenol degradation pathway in *Aspergillus awamori* strain NRRL 3112. Two synthetic oligonucleotides were used as hybridizing probes. Both probes were homologous correspondingly to the 5' end of *phyA* gene coding for phenol hydroxylase and *cis,cis*-muconate lactonizing enzyme coding gene in *T. cutaneum*. The results of these investigations showed that *Aspergillus awamori* NRRL 3112 may carry genes similar to those of *Trichosporon cutaneum* strains known as capable to degrade phenol.

Резюме:

Доказано е, че щам *Aspergillus awamori* NRRL 3112 расте на фенол като единствен въглероден и енергиен източник. Установени са стойностите на ензимните активности на вътреклетъчните ензими фенол хидроксилаза (0.1 U/mgP), катехол 1,2 диоксигеназа (0.18 U/mgP) и *цис,цис*-муконат лактонизиращ ензим (0.19 U/mgP). Бяха извършени ДНК хибридационни анализи в опит да се установи наличието на генни последователности, свързани с пътя на разграждане на фенол при щам *Aspergillus awamori* NRRL 3112. Бяха използвани два синтетични олигонуклеотида като хибридационни сонди. И двете сонди бяха хомоложни съответно на 5' края на *phyA* гена, кодиращ фенол хидроксилаза и ген кодиращ *цис,цис*-муконат лактонизиращ ензим в *T. cutaneum*. Резултатите от тези изследвания показват, че *Aspergillus awamori* NRRL 3112 може да носи гени, подобни на тези на щамовете от вида *Trichosporon cutaneum*, известни със способността си да разграждат фенол.

12. Gerginova M., Zlateva P., Peneva N., Alexieva Z. Influence of phenolic substrates utilised by yeast *Trichosporon cutaneum* on the degradation kinetics. (2014) *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 28 (1), 33-37.

Abstract:

The degradation kinetics of different phenolic substrates utilised by *Trichosporon cutaneum* R57 was studied. The following compounds were used as substrates: phenol, resorcinol, hydroquinone, 3-nitrophenol, 2,6-dinitrophenol, 3-chloro-phenol and *p*-cresol. The specific degradation rates (Qs) were described by a Haldane kinetic model. The unknown model parameters were estimated using the mathematical optimisation procedure for direct search. The results obtained demonstrated that Qs varied greatly in the experiments carried out. The level of biodegradability depended on the different structure and toxicity of compounds used as carbon substrates. The highest Qs values were observed for less toxic hydroxylated phenols (0.77- 0.85 h⁻¹), while the most toxic chlorinated phenols were characterised with the lowest Q s values (0.224 h⁻¹). The results obtained with different oncentrations of resorcinol (from 0.2 to 0.8 g l⁻¹) and 2,6-dinitrophenol (from 0.2 to 0.7 g l⁻¹) demonstrated a growing inhibitory effect directly correlating with the extended time necessary for complete degradation of both compounds.

Резюме:

Изследвана е кинетиката на разграждане на различни фенолни субстрати, усвоявани от *Trichosporon cutaneum* R57. Като субстрати са използвани следните съединения: фенол, резорцинол, хидрохинон, 3-нитрофенол, 2,6-динитрофенол, 3-хлоро-фенол и *p*-крезол. Специфичните скорости на разграждане (Qs) са описани чрез кинетичен модел тип Haldane. Неизвестните параметри на модела бяха оценени с помощта на математическата оптимизационна процедура за директно търсене. Получените резултати показват, че Qs варират значително в проведените експерименти. Нивото на биоразградимост зависи от различната структура и токсичността на съединенията, използвани като въглеродни субстрати. Най-високите стойности на Qs се наблюдават при по-малко токсични хидроксилирани феноли (0.77 - 0.85 h⁻¹), докато най-токсичните хлор заместени феноли се характеризират с най-ниски стойности на Qs (0.224 h⁻¹). Резултатите, получени при различни концентрации на резорцинол (от 0.2 до 0.8 g l⁻¹) и 2,6-динитрофенол (от 0.2 до 0.7 g l⁻¹), демонстрират нарастващ инхибиращ ефект, пряко корелиращ с удълженото време, необходимо за пълно разграждане на двете съединения.

13. Abrashev R., Feller G., Kostadinova N., Krumova E., Alexieva Z., **Gerginova M.**, Spasova B., Miteva-Staleva J., Vassilev S., Angelova M. Production, purification, and characterization of a novel cold-active superoxide dismutase from the Antarctic strain *Aspergillus glaucus* 363. (2016) *Fungal Biology*, 120 (5), 679-689.

Abstract:

The Antarctic fungal strain *Aspergillus glaucus* 363 produces cold-active (CA) Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD). The strain contains at least one gene encoding Cu/Zn-SOD that exhibited high homology with the corresponding gene of other *Aspergillus* species. To our knowledge, this is the first nucleotide sequence of a CA Cu/Zn-SOD gene in fungi. An effective laboratory technology for *A. glaucus* SOD production in 3 L bioreactors was developed on the basis of transient cold-shock treatment. The temperature downshift to 10° C caused 1.4-fold increase of specific SOD

activity compared to unstressed culture. Maximum enzyme productivity was $64 \times 10^3 \text{ U kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Two SOD isoenzymes (Cu/Zn- SODI and Cu/Zn-SODII) were purified to electrophoretic homogeneity. The specific activity of the major isoenzyme, Cu/Zn-SODII, after Q-Sepharose chromatography was 4000 U mg^{-1} . The molecular mass of SODI (38 159 Da) and of SODII (15 835 Da) was determined by electrospray quadropole time-of-flight (ESI-Q-TOF) mass spectrometry and dynamic light scattering (DLS). The presence of Cu and Zn were confirmed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). The N-terminal amino acid sequence of Cu/Zn-SODII revealed a high degree of structural homology with Cu/Zn-SOD from other fungi, including *Aspergillus* species.

Резюме:

Антарктическият шам филаментозни гъби *Aspergillus glaucus* 363 продуцира активна при ниски температури (СА) Cu/Zn-супероксид дисмутаза (SOD). Шамът съдържа поне един ген, кодиращ Cu/Zn-SOD, който показва висока хомология със съответния ген при други видове *Aspergillus*. Доколкото ни е известно, това е първата нуклеотидна последователност на СА Cu/Zn-SOD ген при филаментозни гъби. Разработена е ефективна лабораторна технология за получаване на SOD от *A. glaucus* в 3 л биореактор в условията на нискотемпературен стрес. Понижаването на температурата до 10°C води до 1.4-кратно увеличение на специфичната активност на SOD в сравнение с култура без стрес. Максималната ензимна производителност е $64 \times 10^3 \text{ U kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Два изоензима SOD (Cu/Zn-SOD I и Cu/Zn-SOD II) бяха пречистени до електрофоретична хомогенност. Специфичната активност на основния изоензим, Cu/Zn-SOD II, след Q-Sepharose хроматография е 4000 U mg^{-1} . Молекулната маса на SOD I (38 159 Da) и на SOD II (15 835 Da) беше определена чрез маспектрометрия (ESI-Q-TOF) и динамично разсейване на светлината (DLS). Наличието на Cu и Zn беше потвърдено чрез мас-спектрометрия с индуктивно свързана плазма (ICP-MS). Аминокиселинна последователност в N-края на Cu/Zn-SODII разкрива висока степен на структурна хомология с Cu/Zn-SOD от други гъби, включително видове *Aspergillus*.

14. Spankulova G., Gerginova M., Peneva N., Alexieva Z. Molecular identification of petroleum-degrading bacteria and characterization of their biodegradation potential related phenol. (2018) *Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences*, 71 (11), 1473-1478.

Abstract:

The chemical composition of petroleum oil is complex and contains diverse groups of compounds. The aromatic fraction of petroleum constitutes a substantial part of it. Many microorganisms with oil degrading activity have different enzymatic mechanisms for catabolizing a variety of aromatic compounds. Phenol is a basic compound in the study of biodegradation of phenolic compounds. Microbial isolates capable to degrade 60–80% of oil and diesel and 46% of engine oil have been obtained from oil polluted soils in the region of Kumkol, Kyzylorda district in Kazakhstan. In the present study the taxonomic affiliation of eight selected petroleum-degrading bacterial cultures was identified by 16S rDNA sequencing and their ability to use

phenol for its growth and metabolism was investigated. Two strains capable to utilize completely 0.3 g/l phenol as a sole carbon source were found. One of them (belonging to g. *Rhodococcus*) showed high degradation activity towards phenol. For a period of 36 h strain doubled its initial biomass. Spectrophotometric analysis showed complete consumption of the amount of phenol in the culture medium. The second strain (belonging to g. *Gordonia*) degraded completely 0.3 g/l phenol but for longer period of time (90 h).

Резюме:

Химичният състав на петрола е сложен и съдържа различни групи съединения. Ароматната фракция на петролните продукти представлява значителна част от него. Много микроорганизми способни да разграждат петролни продукти, притежават различни ензимни механизми за разграждане на ароматни съединения. Фенолът е основно съединение при изследванията на разграждането на ароматни съединения. Микробни изолати, способни да разграждат 60-80% от петрола и дизеловото гориво и 46% от двигателното масло, са изолирани от замърсени с нефт почви в района на Кумкол, област Кизилорда в Казахстан. В настоящото изследване е определена таксономичната принадлежност на осем избрани бактериални култури, разграждащи петролни продукти, чрез секвениране на 16S rDNA и е изследвана тяхната способност да усвоява фенол. Установени са два щам, способни да използват напълно 0.3 g/l фенол като единствен източник на въглерод. Единия от тях (принадлежащ към род *Rhodococcus*) показва висока деградационна активност спрямо фенола. За период от 36 часа щамът удвоява първоначалната си биомаса. Спектрофотометричният анализ показва пълно изчерпване на количеството фенол в хранителната среда. Вторият щам (принадлежащ към род *Gordonia*) разгражда напълно 0.3 g/l фенол, за по-дълъг период от време (90 h).

15. Bratkova S., Alexieva Z., Angelov A., Nikolova K., Genova P., Ivanov R., **Gerginova M.**, Peneva N., Beschkov V. Efficiency of microbial fuel cells based on the sulfate reduction by lactate and glucose. (2019) *International Journal of Environmental Science and Technology*, 16 (10), 6145-6156.

Abstract:

The influence of lactate and glucose, used as electron donors on the rate of sulfate reduction, electricity generation and microbial communities in anodic chamber of microbial fuel cells, was studied. Effective sulfate and chemical oxygen demand removal was achieved at different hydraulic retention times by the laboratory installations, consisting of anaerobic fixed-bed reactor and microbial fuel cell with air-cathode. The highest maximum power density of 349 mW/m² was obtained in the lactate-fed microbial fuel cell under hydraulic retention time of 66 h. The type of electron donor had a great impact on the composition of the microbial community. The metagenomic data obtained showed that the most abundant phylum in both bacterial communities was *Proteobacteria*—67% and 46% when using lactate and glucose as an electron donor, respectively. *Euryarchaeota* was found in significant quantities (11.57%) in the microbial communities cultivated on lactate, whereas when using glucose, they were 0.01%. The bacterial

community at glucose was characterized with the phyla belonging to *Verrucomicrobia* (15.11%) and *Spirochaetes* (17.26%). In both microbial communities in anodic chamber were presented sulfate-reducing bacteria that can incompletely oxidize the organic compound usually with acetate as an end product, as the dominant microbial species among sulfate-reducing bacteria was *Desulfomicrobium baculatum* (3.21%) in the microbial fuel cell at lactate, and *Desulfovibrio mexicanus* dominated (2.73%) in the microbial fuel cell at glucose.

Резюме:

Изследвано е влиянието на лактат и глюкоза, използвани като донори на електрони върху скоростта на процеса сулфат-редукция, генерирането на електроенергия и микробните съобщества в анодната камера на микробни горивни клетки. Ефективно отстраняване на сулфати и ХПК (химически потребен кислород) е постигнато при поддържане на различно контактно време в лабораторни инсталации, състоящи се от анаеробен реактор с фиксирана биомаса и микробна горивна клетка с въздушен катод. Най-висока максимална плътност на мощността - 349 mW/m^2 е достигната в захранваната с лактат микробна горивна клетка при контактно време 66 часа. Видът на донора на електрони оказва голямо влияние върху състава на микробната ценоза. Получените метагеномни данни показват, че най-разпространеният тип в двете бактериални съобщества е *Proteobacteria* е съответно 67% и 46%, при използване на лактат и глюкоза като донор на електрони. *Euryarchaeota* се открива в значителни количества (11.57%) в микробните съобщества, култивирани върху лактат, докато при използване на глюкоза те са 0.01%. Микробната ценоза при субстрат глюкоза се характеризира с типове, принадлежащи към *Verrucomicrobia* (15.11%) и *Spirochaetes* (17.26%). И в двете микробни съобщества в анодната камера бяха установени сулфат-редуциращи бактерии, които непълно окисляват органичните съединения обикновено до ацетат като краен продукт, като доминантен микробен вид от сулфат-редуциращите бактерии в микробната горивна клетка при лактат бе *Desulfomicrobium baculatum* (3.21%), а в микробната горивна клетка с глюкоза, доминантен вид бе *Desulfovibrio mexicanus* (2.73%).

16. Parvanova-Mancheva T., Vasileva E., Beschkov V., **Gerginova M.**, Stoilova-Disheva M., Alexieva Z. Biodegradation potential of *Pseudomonas putida* to phenol compared to *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 and *Pseudomonas denitrificans* strains. (2020) *Journal of Chemical Technology and Metallurgy*, 55 (1), 23-27.

Abstract:

Phenol is a waste product from petroleum, pharmaceutical and plastic industries. It is a major environmental pollutant. There is a variety of methods for treatment of waste water containing phenol. The applied physico-chemical methods are often economically unfeasible and may cause onset of other toxic products. For this reason, microbiological methods are preferred because the microorganisms present use phenol as the sole source of carbon and energy. After preliminary adaptation of *Pseudomonas putida* strain, a degradation of 1.9 g/l of phenol is achieved over a period of 23 days using a laboratory bioreactor and a feed process. The experiments carried out

prove also the tolerance of *Xhantobacter autotrophicus* GJ10 and *Pseudomonas denitrificans* to the presence of 0.3 g/l of phenol in the culture medium.

Резюме:

Фенолът е отпадъчен продукт от петролната, фармацевтичната и пластмасовата промишленост. Той е основен замърсител на околната среда. Съществуват различни методи за пречистване на отпадни води съдържащи фенол. Прилаганите физико-химични методи често са икономически неосъществими и могат да доведат до появата на други токсични продукти. Поради тази причина се предпочитат микробиологичните методи, тъй като микроорганизмите използват фенол като единствен източник на въглерод и енергия. След предварителна адаптация на щам *Pseudomonas putida* е постигнато разграждане от 1.9 g/l фенол за период от 23 дни в лабораторен биореактор с подхранване. Извършените експерименти доказват толерантността на *Xhantobacter autotrophicus* GJ10 и *Pseudomonas denitrificans* към наличието на 0.3 g/l фенол в хранителната среда.

17. Beschkov V., Alexieva Z., Parvanova-Mancheva T., Vasileva E., **Gerginova M.**, Peneva N., Stoyanova K. Phenol biodegradation by the strain *Pseudomonas putida* affected by constant electric field. (2020) *International Journal of Environmental Science and Technology*, 17 (4), 1929-1936.

Abstract:

Phenol and its derivatives are some of the most dangerous organic pollutants released into the environment. Various methods, including microbial processes, have been applied to reduce their concentrations to acceptable values in the waste streams. The present study considers the effect of constant electric field on the phenol biodegradation potential of the strain *Pseudomonas putida* in aqueous media. The following significant effects are observed: the constant electric field applied enhances the specific growth rate of the bacteria studied at a specified anode potential, i.e., 0.8 V versus the standard hydrogen electrode, compared to a culture without application of electricity. The amount of destroyed phenol at this anode potential is three times higher than that at the control experiment. The enzyme analyses show that the electric field stimulates the activity of phenol hydroxylase (from 0.095 to 0.281 U/mg protein) and catechol-1,2-dioxygenase (from 0.688 to 1.22 U/mg protein) at the same anodic potential. The lack of catechol-2,3-dioxygenase activity is an indication for the ortho-oxidative pathway for phenol biodegradation in the case under consideration. Comparison of the electric current efficiencies, measured (3.2 mAh) and stoichiometric (2.54 Ah) ones shows that the stimulation effect is of biochemical origin, but not due to electrochemical processes on the anode.

Резюме:

Фенолът и неговите производни са едни от най-опасните органични замърсители в околната среда. За намаляване на техните концентрации до приемливи стойности в отпадъчните продукти, се прилагат различни методи, включително и микробиологични процеси. Настоящото изследване разглежда ефекта на постоянното електрическо поле

върху потенциала за биоразграждане на фенол на щама *Pseudomonas putida* във водна среда. Наблюдават се следните значими ефекти: приложеното постоянно електрическо поле повишава специфичната скорост на растеж на изследваните бактерии при определен аноден потенциал, т.е. 0.8 V спрямо стандартния водороден електрод, в сравнение с култура без прилагане на електричество. Количеството деградиран фенол при този аноден потенциал е три пъти по-високо от това при контролния експеримент. Ензимните анализи показват, че електрическото поле стимулира активността на фенол хидроксилаза (от 0.095 до 0.281 U/mg протеин) и на катехол-1,2-диоксилаза (от 0.688 до 1.22 U/mg протеин) при еднакъв аноден потенциал. Липсата на катехол-2,3-диоксилазна активност е индикация за *орто*-оксидативния път за биоразграждане на фенола в разглеждания случай. Сравнението на измерената ефективност на електрическия ток, (3.2 m h) и стехиометричната ефективност (2.54 A h) показва, че стимулиращият ефект е от биохимичен произход и не се дължи на електрохимични процеси върху анода.

18. Vasileva E., Parvanova-Mancheva T., Beschkov V., Alexieva Z., **Gerginova M.**, Peneva N. Effects of constant electric field on biodegradation of phenol by free and immobilized cells of *Bradyrhizobium japonicum* 273. (2021) *ChemEngineering*, 5 (4), art. no. 75.

Abstract:

It is shown that bacteria *Bradyrhizobium japonicum* 273 were capable of degrading phenol at moderate concentrations either in a free cell culture or by immobilized cells on granulated activated carbon particles. The amount of degraded phenol was greater in an immobilized cell preparation than in a free culture. The application of a constant electric field during cultivation led to enhanced phenol biodegradation in a free culture and in immobilized cells on granulated activated carbon. The highest phenol removal efficiency was observed for an anode potential of 1.0 V/S.H.E. The effect was better pronounced in a free culture. The enzyme activities of free cells for phenol oxidation and benzene ring cleavage were very sensitive to the anode potential in the first two steps of the metabolic pathway of phenol biodegradation catalyzed by phenol hydroxylase, catechol-1,2-dioxygenase and catechol- 2,3-dioxygenase. It was observed that at an anode potential of 0.8 V/S.H.E., the *meta*-pathway of cleavage of the benzene ring catalyzed by catechol-2,3-dioxygenase became competitive with the *ortho*-pathway, catalyzed by catechol-1,2-dioxygenase. The obtained results showed that the positive effect of constant electric field on phenol biodegradation was rather due to electric stimulation of enzyme activity than electrochemical anode oxidation.

Резюме:

Установено е, че бактериален щам *Bradyrhizobium japonicum* 273 е способен да разгражда фенол в умерени концентрации в свободна клетъчна култура и чрез имобилизирани клетки върху гранулирани частици от активен въглен. Количеството на разградения фенол е по-голямо при имобилизирани клетки, отколкото в свободна култура. Прилагането на постоянно електрическо поле по време на култивирането води до по-добро биоразграждане на фенол в свободна култура и в имобилизирани клетки върху гранулиран

активен въглен. Най-високата ефективност на деградация на фенола се наблюдава при аноден потенциал от 1.0 V/S.H.E. Ефектът беше по-добре изразен в свободна култура. Ензимната активност за фенолно окисление и разцепване на бензеновия пръстен при свободните клетки е много чувствителна към анодния потенциал в първите два етапа на метаболитния път на биоразграждане на фенол, катализирано от ензимите фенол хидроксилаза, катехол-1,2-диоксигеназа и катехол-2,3-диоксигеназа. При аноден потенциал от 0.8 V/S.H.E., се установява и наличие на *мета*-път на разцепване на бензеновия пръстен, катализиран от катехол-2,3-диоксигеназа, който е конкурентен с *орто*-пътя, катализиран от катехол-1,2-диоксигеназа. Получените резултати показват, че положителният ефект на постоянното електрическо поле върху биоразграждането на фенола се дължи по-скоро на електрическо стимулиране на ензимната активност, отколкото на електрохимично анодно окисление.

Публикации за изпълнение на допълнителни критерии за израстване на академичния състав в Институт по Микробиология - БАН

19. Gerginova M., Peneva N., Manasiev J., Alexieva Z. Degradation of hydroxylated phenols by an *Aspergillus fumigatus* strain isolated from Antarctica. (2014), 93-98. In: *Industrial, Medical and Environmental Applications of Microorganisms*, Ed. Antonio Méndez-Vilas, Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, ISBN:978-90-8686-243-6.

Abstract:

The investigated *Aspergillus fumigatus* strain AL9 has been taxonomically determined by molecular methods (NCBI Acc. No. JQ 639072.1) and the ability to utilize 0.5 g/l phenol as a sole carbon source was demonstrated. It was observed that *A. fumigatus* strain AL9 had a different capability to degrade the isomeric forms of both hydroxylated phenols. The complete degradation and assimilation of catechol as a sole carbon source was performed for about 72 h while the hydroquinone was degraded and utilize much slower and the observed decrease of its concentrations for the same period of time was 30%. The complete hydroquinone degradation was performed in 96 hours. The intracellular enzyme activities of phenol hydroxylase, catechol 1,2-dioxygenase, and hydroquinone hydroxylase in cells of *Aspergillus fumigatus* strain AL9, cultivated in a medium containing 0.3 g/l catechol or hydroquinone as a single carbon substrate were determined. The catechol 1,2-dioxygenase enzyme activity showed the highest activity (0.427 U/mg protein) in the logarithmic growth phase in the case of culturing the strain in a medium sole carbon source catechol. The enzyme hydroquinone hydroxylase has kept a constant but not high level of activity (about 0.040 U/mg protein) during all phases of growth and degradation process. The gene coding for catechol 1,2-dioxygenase was identified using set of oligonucleotide primers designed in the course of this study. The DNA sequence (1063 bp) of the catechol dioxygenase gene of the strain *A. fumigatus* AL9 was obtained. The BLAST analysis demonstrated 99% identity with the corresponding *Aspergillus fumigatus* Af293 sequence.

Резюме:

Изследваният щам *Aspergillus fumigatus* AL9 е определен таксономично чрез молекулярни методи (NCBI Acc. No. JQ 639072.1) и е демонстрирана способността му да усвоява 0.5 g/l фенол като единствен източник на въглерод. Наблюдавана е, различната способност на щам *A. fumigatus* AL9 да разгражда изомерните форми на два хидроксилирани фенола. Пълното разграждане и асимилация на катехола като единствен източник на въглерод се извършва за около 72 часа, докато хидрохинонът се разгражда и усвоява много по-бавно и наблюдаваното намаляване на неговата концентрация за същия период от време е 30%. Пълното разграждане на хидрохинон се извършва за 96 часа. Определени са вътреклетъчните ензимни активности на фенол хидроксилаза, катехол 1,2-диоксигеназа и хидрохинон хидроксилаза в клетки на щам *Aspergillus fumigatus* AL9, култивирани в среда, съдържаща 0.3 g/l катехол или хидрохинон като единичен въглероден субстрат. Ензимната активност на катехол 1,2-диоксигеназа показва най-висока активност (0.427 U/mgP) в логаритмичната фаза на растеж при култивиране на щамата в среда с единствен източник на въглерод катехол. Ензимът хидрохинон хидроксилаза поддържа постоянно, но не високо ниво на активност (около 0.040 U/mgP) по време на всички фази на процеса на растеж и деградация. Генът, кодиращ катехол 1,2-диоксигеназа, беше идентифициран с помощта на набор от олигонуклеотидни праймери, създадени в хода на това изследване. Получена е ДНК последователността (1063 bp) на катехол диоксигеназен ген на щамата *A. fumigatus* AL9. BLAST анализът показва 99% идентичност със съответната последователност *Aspergillus fumigatus* Af293.

20. Gerginova M., Litova K., Manasiev J., Peneva N., Bibova R., Krastanov A., Alexieva Z. Studies on biodegradation of phenolic compounds by *Aspergillus glaucus* strain. (2016), 135-139. In: *Microbes in the Spotlight: Recent Progress in the Understanding of Beneficial and Harmful Microorganisms*. Edited by A. Méndez-Vilas, BrownWalker Press, Boca Raton, Florida, USA, ISBN:10:1-62734-612.

Abstract:

Mould strain *Aspergillus glaucus* AL1 was isolated from soil probes, taken from Livingston Island, Antarctica. It was established that the strain could degrade and assimilate completely 0.3 g/l phenol, catechol, hydroquinone, *o*-, *m*- and *p*-cresol as a sole carbon sources for a period of 18-96 h. The intracellular specific enzyme activities of phenol hydroxylase and catechol 1,2-dioxygenase were determined in cleared cell lysates, derived from cells cultivated with 0.3 g/l of each one of the studied compounds. Phenol or catechol correspondingly was included as single substrates in the reaction mixture for enzyme activity determination. Phenol hydroxylase activity in cells cultured with phenol was 0.254 U/mg protein while in the experiments with hydroquinone or catechol were found significantly lower levels of enzyme activity - 0.125 U/mg protein and 0.179 U/mg protein, respectively. Catechol 1,2-dioxygenase [EC 1.13.11.1] in *A. glaucus* AL1 strain kept high values of activity in cells grown in a medium comprised phenol or catechol (2.11 U/mg protein and 1.39 U/mg protein). The obtained catechol 1,2-dioxygenase

activities in *A. glaucus* AL1 cultured with hydroquinone, *o*-, *m*- or *p*-cresol were significantly lower. The identification and partial sequence of the gene encoding the phenol hydroxylase in *A. glaucus* AL1 strain was performed. A 728 bp DNA sequence was obtained as a result of carried out PCR and sequence analyses. The established nucleotide sequence has been deposited in the NCBI nucleotide sequence databases under accession number KM360482.1.

Резюме:

Щам на плесен *Aspergillus glaucus* AL1 е изолиран от почвени проби, взети от остров Ливингстън, Антарктида. Установено е, че щамът може да разгради и усвои напълно 0.3 g/l фенол, катехол, хидрохинон, *o*-, *m*- и *p*-кресол като единствен източник на въглерод за период от 18-96 часа. Вътреклетъчните специфични ензимни активности на фенол хидроксилаза и катехол 1,2-диоксигеназа бяха определени в клетъчни лизати, получени от клетки, култивирани с 0.3 g/l от всяко едно от изследваните съединения. Фенолът или катехолът съответно бяха включени като единични субстрати в реакционната смес за определяне на ензимната активност. Активността на фенол хидроксилазата в клетки, култивирани с фенол, е 0.254 U/mgP, докато в експериментите с хидрохинон или катехол са установени значително по-ниски нива на ензимна активност - съответно 0.125 U/mgP и 0.179 U/mgP. Катехол 1,2-диоксигеназа [EC 1.13.11.1] в *A. glaucus* AL1 щам поддържа високи стойности на активност в клетки, отглеждани в среда, съдържаща фенол или катехол (2.11 U/mgP и 1.39 U/mgP). Получените катехол 1,2-диоксигеназни активности в *A. glaucus* AL1, култивиран с хидрохинон, *o*-, *m*- или *p*-кресол, са значително по-ниски. Извършена е идентификация и частична последователност на гена, кодиращ фенол хидроксилазата в щам *A. glaucus* AL1. В резултат на проведени PCR и секвенционен анализ беше получена ДНК последователност от 728 bp. Установената нуклеотидна последователност е депозирана в базите данни за нуклеотидни последователности на NCBI под номер KM360482.1.