

## РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационен труд, представен пред научно жури,  
сформирано със заповед № Ро038-501/23.07.2015  
на Ректора на Софийския университет „Св. Климент Охридски”  
за получаване на образователната и научна степен “доктор”

Автор: **Ралица Валентинова Илиева**

Тема: **Характеристика на ацидофилни тионовни бактерии в сулфидни находища в България**

Рецензент: **проф. Мария Ангелова, дбн**

Устойчивото развитие на всяка икономика зависи от голям брой фактори, но един от най-важните безспорно е наличието на първични ресурси от метали. Едновременно с използването на нови ресурси, подобряването на вече съществуващите техники в минодобива може да доведе до възстановяване на такива, които до този момент не са били икономически ефективни. Процесите за извличане на метали на базата на микроорганизми предлагат възможността да се получат метали от минерални ресурси, недостъпни за конвенционалните технологии. Ацидофилните тионовни бактерии със своята способност да окисляват сярсъдържащи съединения, както и да оцеляват в местообитания с висока киселинност и концентрация на метали, играят жизнено важна роля в биоизлугването на сулфидни минерали от различни антропогенни находища. Тяхната експлоатация за обработката на медни, златни и други руди е част от една от основните области на биотехнологията с пазарна цена от милиарди долари. Освен посочените предимства, трябва да се отбележат и доказаните социални и екологични ползи. Поставен между интересите на бизнеса и науката, проблемът за използването на ацидофилните тионовни микроорганизми има редица нерешени въпроси, като напр. състава на съобществата, взаимоотношенията между представителите в тях, генетичната детерминираност на специфичните им свойства, възможностите за използване в процесите на излугване на минерали, контрол и управление на тези процеси и редица др. В този аспект е и представеният дисертационен труд, а гореизложеното ясно очертава неговата **актуалност и перспективност**. Още повече, че в интензивния поток от научни разработки, много важен елемент е проучването на национално-значими находища - основен акцент и в разработката на докторантката Ралица Илиева.

Като докторант, Илиева има сериозно предимство – да стане част от школата на проф. Венета Грудева, която е пионер в изучаване на биологията и приложението на ацидофилни бактерии и археи. На базата на опита и постигнатото до сега, докторантката и научният ѝ ръководител определят основната теоретична насоченост на изследването -

получаване на нови знания относно микробните съобщества в типични находища на сулфидни минерали в България и техните метаболитни активности. В приложен аспект, дисертацията предлага нови решения за използването им при третиране на минерални суровини.

Дисертационният труд е конструиран в традиционна форма със съответните раздели. Написан е на 208 стандартни компютърни страници и е онагледен с 59 таблици и 48 фигури, по-голямата част от които са комплексни. Трябва да се подчертае, че Ралица Илиева познава много добре постиженията в тази област, както по отношение на характеристиката на съобществата, местообитанията, метаболитната им активност и молекулярно-биологичните изследвания, така и потенциала за тяхното използване. **Литературният обзор** представя възможно най-пълно и целенасочено съвременното състояние на проблема в световен мащаб. Включени са литературни източници, публикувани в началото на миналия век и в последните 10 години (над 30%). Отдадено е внимание и на българският опит в този аспект. Много полезна идея е включването на подраздел „Заклучение”, в което докторантката накратко отбелязва нерешените въпроси. Това дава възможност на читателя да получи информация за новото в разработката.

Въз основа на този задълбочен анализ е изведена целта на настоящата дисертация, касаеща охарактеризиране на ацидофилната тионова микрофлора в перспективни български находища на сулфидни минерали и потенциала за тяхното използване. Тя е дефинирана ясно и конкретно, за нейното реализиране са формулирани 6 взаимно обвързани и логически следващи задачи.

**Разделът "Материали и методи"** демонстрира широк набор от методи, съобразени с конкретните изисквания на експеримента. Те са както рутинни, така и съвременни, микробиологични, биохимични, молекулярно-биологични, биотехнологични, биоинформатични и др. Заслужава да се подчертае използването на молекулярната таксономия (16S ДНК PCR, RFLP анализ на рДНК), биоинформатичния анализ на ДНК секвенции, определяне на окислителната активност, третиране на минерални суровини и др. Освен това, методите са представени разбираемо, без излишни подробности, но достатъчно пълно, за да бъдат възпроизведени. Експериментите са проведени със съвременна апаратура.

**В раздел „Резултати и дискусия”** е включен огромен експериментален материал, който се характеризира с логическа последователност на разработката. Отделните етапи са разработени обстойно, като в същото време, всеки един от тях е отправна точка за следваща насоченост на научното изследване. Това придава на дисертацията характеристика за цялостност. Докторантката е представила схема на

експерименталната работа (Фиг. 15), с която дава възможност на читателя да добие представа за тази последователност и цялостност.

Направена е детайлна характеристика на биоценозите в 10 находища от различни региони на България, характеризиращи се с определен минероложки състав. За 6 от тях, това е първото изследване на микрофлората. Получените резултати доказват наличие на постоянни компоненти, специфичен състав в зависимост от физико-химичните фактори на средата и доминиращи родове. Установено е, че представителите на ацидофилни и неутрофилни тионовни бактерии и археи от родовете *Acidimicrobium* и *Sulfobacillus* имат съществено значение за експлоатация на находищата. С разработената от Илиева диференцирана схема на базата на селективни хранителни среди и специфични физиологични параметри са изолирани 29 чисти култури от ацидофилни тионовни бактерии (от родовете *Acidithiobacillus* и *Leptospirillum*) и 8 изолати от термоацидофили. Всеки микробиолог може да си представи мащаба на тази част от експерименталната работа. В същия обем е представен и следващия подраздел, в който докторантката е провела идентификация на изолираните щамове по методите на класическата таксономия. След подробна морфологична и физиологична характеристика те са отнесени към видовете *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus ferridurans* и *Acidithiobacillus ferrivorans*.

В следващия етап, Илиева използва съвременни молекулярно-биологични подходи за да получи неоспорими доказателства за таксономията на изолирането щамове. Този етап включва молекулярно-таксономична характеристика чрез 16S рДНК PCR, RFLP и биоинформатичния анализ на ДНК секвенции. Прави впечатление отговорното отношение на докторантката към всички подробности на проведените експерименти. Тя започва с оптимизиране на методиката за култивирането, събирането на биомаса и изолирането на ДНК и прави полезни модификации, които ѝ позволяват да преодолее някои методологични затруднения, произтичащи от специфичните условия на култивиране на изолатите и от липсата на специфични праймери за съпътстващите ацидофилни хемолитотрофи. Направени са подходящи промени и в протокола за PCR анализа с цел повишаване на чувствителността и елиминиране на възможността за неспецифична амплификация. Особеностите при култивиране на използваните обекти е успешно преодоляно с прилагане на PCR-RFLP анализ на 16S рДНК и с последващ биоинформатичен анализ на предварително получените секвенции. В резултат е постигнато ясно разграничаване на доминиращите видове в микробните ценози, обитаващи сулфините находища – *A. ferrooxidans*, *A. thiooxidans* и *L. ferrooxidans*. RFLP анализът не доказва връзка между рестрикционния профил на щамовете и типа на находището. Постигнатото в този подраздел потвърждава мнението, че отбелязаният

RFLP анализ е задължителен в случаите на ацидофилни бактерии от находища в експлоатация или рекултивация.

В търсене на възможности за използване на метаболитната активност на изолираните и идентифицирани щамове са проучени техните растежни параметри и окислителната им способност. Експериментите включват култивиране на 22 щамове (20 щамове *A. ferrooxidans* 1 щам *A. thiooxidans* и 1 щам *L. ferrooxidans*) върху различни субстрати (феройони, елементарна сяра и тиосулфат). Подробното охарактеризиране на развитието им в динамика дава информация за щамовата специфичност към енергетичните източници. Едновременно с това са получени данни за тяхната окислителна активност, които определят насоките за практическото им приложение.

В съответствие с логиката, определена от предварителната схема на експерименталната работа, последният подраздел представя биотехнологичния потенциал на изолираните ацидофили по отношение на минерални суровини с икономическа ефективност. С доказана значимост са резултатите относно най-подходящите бактерии и археи за излугването на медно-сулфидни руди, разработената схема за биодесулфоризация на въглища на базата на ацидофилни тионовидни бактерии и метода за третиране на златоносен пиритен концентрат със значително ускоряване на извличането. С това дисертацията дава заявка за оригинални приложни приноси и поставя изследванията в тази област на ново ниво.

Искам да отбележа, че в раздел „Резултати и дискусия”, едновременно с коректното отразяване на получените данни е представена и много убедителна дискусия на базата на литературата от последните години. Това, разбира се, е възможно благодарение на много доброто познаване на проблема, задълбочената научна разработка и компетентната научна среда, в която е реализирана. В края на всеки подраздел е оформено „Заключение”, което има характер на обобщение на съответните данни и 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, стегнатия научен стил, на който е написана, коректното отразяване на резултатите в таблици, както и тяхното професионално представяне.

Според мен, **изводите** са логично следствие от експерименталните данни и дават необходимата информация за стойността на проведените изследвания. Приемам и формулировката на **приносите**, но считам, че те са повече от тези, представени от автора, а именно:

1. Направена е детайлна характеристика на микробните биоценози в 10 сулфидни находища в България с потенциална икономическа ефективност, някои от тях са проучени за първи път.
2. Разработен е ефективен метод за изолиране на отделни представители от съобщества на ацидофилни тионов хемолитотрофи.
3. Установен е подходящ маркер за видово типирание на изолати от род *Acidithiobacillus*.
4. Оригинален принос е създадената колекция от микроорганизми (бактерии и археи), изолирани от екстремни местообитания и способни да разграждат, трансформират или извличат метали от сулфидни минерали.
5. Селекционирани са ацидофилни бактерии и археи с висока окислителна активност, на базата на които могат да се разработят екологично-насочени биотехнологии за експлоатация на перспективни находища. Доказана е повишената ефективност при:
  - излугване на медно сулфидна руда с екстремно термофилни ацидофилни археи;
  - третиране на въглища от Бобов дол и Марица Изток с ацидофилни тионов бактерии за отстраняване на неорганичната сяра;
  - предварително третиране на златоносен пиритен концентрат с ацидофилни тионов бактерии и повишаване съдържанието на злато.

Към дисертацията на Илиева имам следните **препоръки и въпроси**:

1. Кое наложи представянето на таблици и фигури с еднакви данни в подраздел 5.2. на „Резултати и дискусия”. По мое мнение, този подход трябва да се избягва.
2. Как може да се обясни повишената окислителна активност на изолатите от находища със сулфидни минерали? Каква е ролята на адаптивния отговор?
3. Считате ли, че в групата на изолираните от находищата щамове има достатъчно ефективни представители за да бъдат патентовани?
4. Според Вас, в каква насока трябва да продължи работата по проблема?

Данните от дисертацията са **включени в 3 научни статии и 15 участия в научни форуми**. Всички статии са журнални, една е отпечатана в списание с IF (Biotechnol & Biotechnol Eq) и две в специализираното международно списание Advanced Materials Research. Докладите и постерите са представени на 7 международни и 8 национални

форума. Това ми дава основание да считам, че резултатите на Ралица Илиева са получили и международно признание.

Освен това, докторантката е **участвала в разработването на 9 проекта**: 1 проект по оперативна програма „Развитие на човешките ресурси” и 8 научноизследователски, свързани с темата на дисертацията. Те несъмнено са допринесли за повишаване квалификацията и опита на Илиева и оформянето ѝ като млад учен. Моите **лични впечатления** я определят като отговорен участник в проектна дейност, с изявено умение да работи в екип.

**В заключение** искам да подчертая, че материалът е дисертабилен, темата е изключително актуална и перспективна, експериментите са поставени методично правилно и са осъществени на високо съвременно ниво. Получените резултати са достоверни и са солидна база за следващи научни и приложни разработки, открояват се оригинални научни и приложни приноси. В процеса на обучение докторантката е усвоила широк набор от модерни методи, работа със съвременна апаратура, а така също умението да интерпретира получените резултати, да търси и критично да оценява подобни изследвания в литературата и да формулира обяснения.

Въз основа на направения разбор и като имам предвид актуалността и нивото на работата, **убедено предлагам на уважаемите членове на Научното жури**, сформирано със заповед № Ро038-501/23.07.2015 г. на Ректора на Софийски университет „Св. Климент Охридски” да **присъдят на Ралица Валентинова Илиева образователната и научна степен “доктор”**.

21.08.2015

София

Рецензент:

/проф. М. Ангелова, дбн/