

РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационен труд за получаване на научната степен "доктор" при
Биологическия факултет при СУ "Св. Климент Охридски"

Автор на дисертационния труд: Михаела Владимирова Белухова

Тема на дисертационния труд: "Управление на водопречистването от биофилмни
съобщества в иновационни детоксикационни технологии"

Рецензент: проф. д-р Венко Николаев Бешков

1. Актуалност на разработвания проблем

Интересът към този род изследвания е голям и се определя от два основни фактора. Първият е свързан със замърсяването на природата с ксенобиотици, произвеждани от човека в големи количества. Другият важен фактор е непригодността на химичните методи и технологии за ликвидиране на тези замърсявания, поради което се налагат биотехнологичните методи. През последните десетилетия особено внимание се отделя на използването на имобилизираните върху твърди носители микроорганизми под формата на биофилми за целите на биоремедиацията и биодеградацията на ксенобиотици.

В рецензираната дисертационна работа много успешно се съчетават биотехнологичните методи за биодеградация на ксенобиотици (в частност азобагрила) с нови микробиологични и биохимични изследователски методи. Прави се и успешен опит за приложението на нано-материали (нано-диаманти) за подобряване биодеградационната способност на микробните съобщества в биофилмите.

2. Познава ли дисертантът състоянието на проблема и оценява ли творчески литературния материал?

Литературната справка се основава на над 450 литературни източника. Литературният обзор представлява сериозен и задълбочен преглед на методите за имобилизация на микроорганизмите, процесите, протичащи в биофилмите и методите за тяхното изследване; достатъчно внимание в обърнато на микробиологичните методи.

В литературния обзор авторът се спира последователно и подробно на принципите на биологичното пречистване на отпадъчни води; на характерните особености на биофилмите и на взаимодействията на микробните съобщества, които ги изграждат; за способността на микроорганизмите, фиксирани върху твърди носители да разрушават токсични органични вещества и пр. Направен е преглед на групата от азобагрила, тяхната опасност за околната среда и методите за тяхното обезвреждане чрез биодegradация. Направен е и преглед на нови приложения на нано-материали (нано-диаманти) за подобряване способността на биофилмите да разграждат ксенобиотици.

Литературният преглед има за цел да въведе читателя в целите на дисертацията и методологията, с която се постигат тези цели. Направено е въведение в особеностите на един съвременен биохимичен метод за охарактеризиране на микробни култури (FISH). Литературният преглед е направен с вещина, а целта и задачите на дисертационната работа са изведени от литературния обзор и са много добре формулирани. Единствено приложението на нано-диамантите не е достатъчно убедително, но в тази област не може да се очаква нещо повече, поради новостта на тези материали, които още не са достатъчно добре изучени.

Като цяло, авторът много добре владее литературата по въпросите на дисертацията, което говори за висока компетентност и квалификация.

3. Избраната методика може ли да даде отговор на поставената цел и задачи на дисертационния труд?

Постановката на експерименталната част включва няколко вида експериментални изследвания:

- Изследване на възможностите на съобщества микроорганизми, съдържащи се в активни утайки и имобилизирани върху гел от полиетиленоксид (ПЕО) за биодegradация на азобагрила. Като моделен ксенобиотик (азо-багрило) е използвано багрилото Амарант.
- Изследване на възможностите на бактерии от рода *Pseudomonas* за биодegradация на моделното азо-багрило. Разграничаване на тези бактерии като «култивируеми» и «некултивируеми» и изследване на способността им за биодegradация, като активността и концентрацията на бактериите е оценена с

помощта на метода FISH . Като контролен носител за имобилизирани клетки е използван кварцов пясък.

- Изследване на ефекта на нано-диаманти върху биодegradационната способност на микроорганизмите. Изследвана е тази способност в зависимост от момента на добавяне на нано-диамантите.

Експериментите са проведени на високо лабораторно ниво, като са използвани съвременни биохимични методики (напр. флуоресцентния хибридизационен анализ, FISH), функционален и дигитален анализ за количествено определяне на микроорганизмите, на взаимодействията на микробите в биофилма, следене на ензимната активност на микроорганизмите по отношение на конкретни реакции и пр.

Аналитичните методики са на нужното ниво за целите на дисертацията. Те позволяват да се направят достатъчно сигурни изводи от опитните резултати, например ясно да се разграничат двата вида бактерии от рода *Pseudomonas* и фазите на тяхното развитие; да се следи растежа на микроорганизмите и да се съпостави с хода на биодegradацията. Имам въпрос по отношение на метода за определяне на общия органичен въглерод (ТОС) и съпоставянето на намерените стойности с хода на биодegradационния процес.

4. Кратка аналитична характеристика на естеството и оценка на достоверността на материала, върху който се градят приносите на дисертационния труд

Използуваните методики и опитната постановка дават основание да се смята, че опитният материал е достатъчно достоверен. Представените резултати са на базата на достатъчно повтаряни единични определяния и с необходимата статистическа обработка.

Микробиологичната работа и опитите по дълбочинна ферментация са проведени на високо ниво. Изследването на различните ензимни активности на бактериите: азо-редуктазна, сукцинат-дехидрогеназна и катехол-1,2-диоксигеназна е направено по подходящ и надежден начин. Резултатите за тези активности позволяват да се съди за наредъка в биодegradационния процес и той да съпостави с растежната крива за микроорганизмите.

5. В какво се заключават научните и научно-приложните приноси на дисертационния труд?

Показано е, че от микробните съобщества, участващи в биофилма най-голям принос за биодegradацията на азо-багрилото Амарант имат бактериите от рода *Pseudomonas*. По-слаб е ефектът на другите установени групи: аеробни хетеротрофи, анаеробни хетеротрофи, азодеградиращи микроорганизми, от рода *Acinetobacter* и пр.

Ензимологичните изследвания показват, че отварянето ароматните пръстени става на мета-място с ключов ензим катехол-1,2-диоксигеназа.

Показано е, че бактериите, имобилизирани върху ПЕО намаляват в висока степен общото съдържание на ХПК спрямо бактериите, фиксирани върху пясък, но имат по-слаба биодegradационна активност спрямо моделното багрило. Тук може да се постави въпроса, каква е компонентата на азобагрилото (и неговите разпадни продукти) по отношение общата стойност на ХПК?

Добавянето на частици от нано-диаманти в биофилмите определено води до повишаване на ефективността и скоростта на биодegradация, като моментът на добавянето им е от съществено значение за това, както и за профила на микроорганизмите по височината на биореактора. Тук може да се постави въпроса, как нано-диамантите се задържат постоянно върху биофилма, не се ли измиват при непрекъснат процес? Освен това, определен научен и приложен интерес представлява естеството на положителният им ефект върху биодegradацията на багрилото, повишената устойчивост на бактериите спрямо изследваното багрило и пр..

Детайлно е изследвано разпределението на бактериите *Pseudomonas* (определени като некултивируеми) по височината на реактора в зависимост от момента на добавяне на нано-диамантите. С помощта на FISH-методиката и дигиталния компютърен анализ са разтълкувани особеностите на микробното съобщество в биофилма. В късната фаза на биодegradация определящи са некултивируемите микроорганизми. Стига се до очаквания извод, че в крайния етап решаваща роля за разграждането на багрилото определяща роля имат между-организмовите отношения.

Към дисертационния труд имам още следните въпроси и забележки.

- Защо не са правени опити за имобилизация на активната утайка върху пясъчен носител? Пясъкът е евтин устойчив и едно сравнение с ПЕО би бил полезен от практическа гледна точка.
- Понятието “дебит” при използваната лабораторна методика има различен смисъл от традиционното (преминал обем флуид за единица време). Тук вероятно се има предвид общо изтекло количество, приведено към единица време, тъй като процесите са периодични. Освен това, как това “количество” се свързва с развитието на биофилма (стр. 68, долу)?
- Установената повишена мътност на течността не винаги се дължи на смърт на биомасата, но и на самостоятелно развитие на свободни клетки, откъснали се от биофилма. Има ли данни за това?
- Липсват дефиниции за понятията “некултивируеми” и “култивируеми”, след като и двете групи се размножават.
- Имам забележки относно използването на много чуждици вместо вече установена българска терминология: биоаугментация (усилване, ускоряване), матрикс (вместо матрица), енкапсулиране (включване) и пр.

6. Може ли да се оцени в каква степен дисертационния труд и приносите представляват лично дело на дисертанта?

Аналитичният характер на литературния обзор, добре формулираните цели, богатият и разнообразен експериментален материал, както и дискусията и интерпретацията на опитните данни говорят в полза на това, че докторантката има необходимите данни за достатъчно самостоятелна и отговорна работа. Очевидно е, че дисертационният труд е лично дело на докторантката.

7. Преценка на публикациите по дисертационния труд

Дисертационният труд се основава на 5 научни труда, от които три са в списания с импакт-фактор. Единият е в Journal of Bioremediation&Biodegradation, вторият е в Bulgarian Journal of Agricultural Science, а третият – в Biotechnology & Biotechnological Equipment. Четвъртата работа е публикувана в списанието “Екологично инженерство и опазване на околната среда“. Петата е в сборник от международна конференция без указани страници (International Conference “Ecology – Interdisciplinary Science and Practice”, 2012).

Наукометричните данни напълно задоволяват изискванията за присъжданата образователна и научна степен “доктор”.

8. Авторефератът направен ли е съгласно изискванията, правилно ли отразява основните положения и основните приноси на дисертационния труд?

Авторефератът правилно отразява съдържанието на дисертационния труд.

9. Други въпроси

Запознаването ми с материалите по дисертационния труд, неговото оформяне и постигнатите резултати и приноси ме водят до мнението, че той разкрива нови възможности за научни и приложни изследвания в областта на биотехнологичните процеси за пречистване от ксенобиотици. Тези възможности са главно от методологично естество с приложението на използваните методи и тяхното развитие и адаптиране в различни случаи.

10. Заключение

Изложеното дотук ми позволява убедено да препоръчам на почитаемото жури да присъди научната степен "доктор" на Михаела Владимирова Белухова.

София, 10 септември, 2015 г.

РЕЦЕНЗЕНТ:

(проф. д-н В. Бешков)