

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд, представен за защита по процедура за присъждане на научна и образователна степен “доктор” по научната специалност „Хидробиология“, Шифър 01.06.11.

Тема: „Стратегии за биомениджмънт на самопречистването в седиментите при каскадата от МВЕЦ-ве „Среден Искър“

Автор: Ивайло Димитров Йотинов

Научен ръководител: проф. дбн Яна Топалова

Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски“

Рецензент: доц. д-р Златка Алексиева

Институт по микробиология “Стефан Ангелов”, БАН

Настоящата разработка е посветена на важните проблеми, свързани с пречистването на водите на р. Искър в участъка на каскадата „Среден Искър”. Авторът си поставя тежката задача на основата на разнообразни микробиологични анализи, осъществени с помощта на съвременни научни и менижерски подходи да създаде функциониращи алгоритми за контрол и стратегии за биомениджмънт на рисковите събития в седиментите на каскадата.

Представеният проект за дисертационен труд е с общ обем от 210 страници, разпределени в 7 глави, обозначени според възприетата практика: Увод, Литературен обзор, илюстриран с 3 таблици и 11 фигури, Материали и методи – с 12 таблици и 8 фигури; Глава Резултати и обсъждане се състои от 6 основни раздела и е онагледена с 17 таблици и 56 фигури. Разработката завършва с формулировката на 7 препоръки за бъдещи действия, 14 изводи и 8 приноси. Списъкът на използваната литература включва 341 източника, от които 42 на кирилица, останалите на латиница. 13 от посочените източници са електронни web – страници. Трябва да се отбележи, че 73% от списъка, съдържа материали, публикувани след 2000-та година, а 16% от литературата е от последните 5 години. Това несъмнено отразява широкия интерес и актуалност на проблемите, разглеждани в дисертацията на Ивайло Йотинов.

Към богатия илюстративен материал на дисертационната разработка са добавени и 5 приложения, съдържащи допълнителни фигури посветени на хидрохимичните и микробиологични показатели за водите на р. Искър и микроязовирите в района на каскадата, биогеохимичните цикли на кръговрата на въглерод, азот и фосфор, снимки, направени при анализ със сканираща микроскопия, отразяващи пробовзимането от изследвания район и моделни експериментални постановки.

В Литературния обзор на дисертацията е включена информация, касаеща основните принципи на традиционния и модерния мениджмънт, в това число и на биомениджмънта или управлението на разнообразни екологични и

биотехнологични процеси. Подчертана е необходимостта от съчетанието на биологични знания и специфични мениджърски умения за осъществяването на успешен биомениджмънт. Актуален проблем в областта на екобиотехнологиите е осъществяването на т. нар. „тотален контрол и управление“ на качеството, при който освен получаваната информация от контролни точки се включва и обратната връзка с факторите, характеризиращи околната среда. Централно място е отделено на мониторинга, като ключов елемент и особеностите на биомениджмента на води и седименти.

Демонстрирано е познаване в детайли на изграждането, функционирането и процесите на замърсяване и самопречистване на водите и седиментите в и между микроязовирите и минивецовете на изследваната каскада от малки ВЕЦ-ове. Обосновано е ключовото значение на седиментите при охарактеризиране на качествата на речната вода. На основата на редица предишни оценки на качествата на водите ясно е доказано огромното значение на микробните съобщества за самопречистващия потенциал в различните участъци на р. Искър. Отбелязано е значителното присъствие на групата на хетеротрофните бактерии и коли-бактерии, характерни за битово замърсени води на всички изследвани хабитати в каскадата, както и на представители на родовете *Pseudomonas* и *Acinetobacter* – активни биодеграданти на ксенобиотични замърсители.

В заключителната част на обзора са представени най-съвременните подходи за изследване на замърсени седименти и води, като аналоговото моделиране на базата на биоразграждането на фенол, основните процеси, характеризиращи съвременните биоремедиационни технологии, нанобиотехнологии, при които се прилагат нанодиаменти и въглеродни нанотръбички, както и молекулярния метод за анализ на микробното разнообразие - флуоресцентният ин-ситу хибридизационен анализ (FISH).

Към ясно формулираната основна цел за изграждане на стратегии за биомениджмънт на седиментите при каскадата от минивецове „Среден Искър“ са формулирани 6 основни задачи, които очертават акцентите на дисертацията, а именно да се изследват функционалната структура на микробното съобщество и ключовите детоксикационни процеси в седиментите и да бъдат създадени алгоритми, които формират стратегии за биоуправлението на самопречистването и детоксикацията на замърсени седименти.

Глава „Материали и методи“ започва с подробно излагане на работната хипотеза, включваща събиране на информация за екосистемата, изолирането на микробните доминанти, способни да разграждат токсични замърсители, моделиране на процесите на самопречистване в подходящи условия, чрез подбор на химични, технологични, кинетични, микробиологични и ензимологични показатели, приложение на нанодиаменти като аугментационен фактор и FISH - анализ за проследяване и развитие на алгоритми за управление на такива процеси в

седиментите на каскадата „Среден Искър”. Представена е и оригинална схема на експерименталните стъпки в дисертационния труд.

Към глава „Материали и методи” са включени и описани както стандартни микробиологични, химични и ензимологични методи за анализ, така и някои от най-модерните методи прилагани в областта на съвременните биотехнологии. Използването на всички описани методи за разработката на настоящата дисертация характеризира докторанта като високо квалифициран експериментатор с мултидисциплинарен арсенал за изследователска дейност.

В първата част на глава “Резултати и обсъждане” е направен обстоен анализ на самопречиствателния потенциал в ключови точки, включващи 5 станции и 4 язовира в изследвания участък на р. Искър, по време на различни сезони и съответно пълноводие. Чрез няколкогодишния мониторинг на базови ензимологични и микробиологични индикаторни параметри в седиментите, като динамика на ключови групи микроорганизми, динамика на аеробната и анаеробната сумарна дехидрогеназна активности, индекс на фосфатазна активност и нитрат-редуктазна активност е проследено влиянието на различни типове замърсявания върху състоянието на речните води. Обсъдени са основните фактори, причиняващи различните типове замърсявания и реакцията на микробните съобщества със съществен принос за процесите на самопречистване.

Проведените корелационни анализи на ензимологичните и микробиологични показатели в седиментите на язовирите при МВЕЦ-ве от каскада „Среден Искър“ ясно доказват връзката между аеробната дехидрогеназна активност и бактериите от р. *Pseudomonas* и ендо-бактериите, които показват значението на тези бактерии за минерализацията на органичното замърсяване.

Като основен извод от тези наблюдения се налага наличието на интензивни самопречиствателни процеси и значителен потенциал за отстраняване на различни замърсявания с битово-отпадъчен произход и биодетоксикация.

Оценени са реалните и потенциални рискови фактори като органично натоварване и акумулиране на тежки метали и други токсични замърсители в седиментите от каскадата, липсата на биоремедиационни технологии за седиментите, съдържащи токсични и органични замърсители и задържане на седименти в МВЕЦ-вете.

В резултат на установените сходни зависимости, ясно изразени при *in situ* изследванията в района на каскада „Среден Искър”, докторантът продължава изследванията си и прилага принципите на биомениджмънта върху седиментите на яз. Лъкатник.

Във втория раздел на тази глава от дисертационния труд са описани реални експерименти, целящи идентифицирането на доминиращи микробни видове, притежаващи значителен деградационен и следователно бидетоксикационен потенциал в нетретирани и предварително адаптирани седименти от яз. Лакатник.

Представени са и резултатите от аналоговото моделиране на биодетоксикационен процес с помощта на представител на р. *Pseudomonas*, изолиран от седиментите на яз. Лакатник. Проследен и проучен е аугментираният ефект на нанодиамантите и въглеродни едностенни нанотръбички при разграждането на фенол. Чрез сравняване на кинетичните параметри на процесите на разграждане на фенол е установено, че НД ускоряват процеса на елиминиране на фенола в началните фази докато в контролата и варианта с НТ, той е по-бавен. В края на процеса и в трите работни варианта се установява почти пълно елиминиране на фенола с ефективност над 92 %. Проведени са и ензимологични анализи, включващи ключови за фенолния катаболизъм ензими, които потвърждават характера на процеса на фенолна биодеградация, стимулиран от присъствието на нанодиаменти в средата. Чрез сканираща електронна микроскопия е доказано формирането на консорциуми от клетки на *Pseudomonas* и нанодиаменти в началните фази на фенолна биодеградация и на практика се илюстрира регулаторната роля на нанодиамантите при промяна на скоростта на разграждане на фенол. Установен е и положителния ефект от приложението на нанотръбичките в процеса на фенолна деградация, но той е значително по-нисък. Потвърждава се наблюдението, че и в двата варианта функционират двата алтернативни, *орто*- и *мета*- пътя за разцепване на бензеновото ядро.

В следващите експерименти, в които се създават условия близки до реалните в езерни седименти при критично натоварване с фенол са симуляция на рискови ситуации. Като аугментационен фактор са приложени нанодиаменти, а флуоресцентен *in-situ* хибридизационен (FISH) анализ е използван за проследяване на реструктурирането на микробните съобщества по време на елиминирането на фенола в средата. Установено е, че нанодиамантите, паралелно с разграждането на фенола, стимулират и азотната обмяна в ранната фаза на процеса.

При симулирането на ситуация с неколнократно взривно замърсяване с фенол (2-ри, 48-ми и 72-ри часове) е проследена адаптацията на микробните съобщества и биодеградационния процес в условия на наслагващи се концентрации. Осъществен е многокомпонентен, взаимнообвързан контрол на настъпващите промени в кинетичните характеристики на базата на остатъчните концентрации фенол. Интересен факт е, че след спадане на концентрацията на замърсителя до критичния минимум започва, макар и бавно възстановяване на биодеградационния капацитет на микробните съобщества в седиментите. Установено е, че поради адсорбиращите си свойства, нанодиамантите подпомагат микробната реадaptация. Стойностите за специфична скорост на растеж показват негативна модулация в първата фаза и положителен ефект във втората фаза (след възстановяването) на разграждане на фенол под влияние на нанодиамантите. В хода на описаните експерименти е изследвана ензимната активност на редица ензими, участващи във фенолната деградация и утилизация. Отбелязва се пълно

съответствие на получените резултати с характера на деградационната крива, като напр. най-висока диоксигеназна активност в първия етап от 48 часа и най-ниска оксигеназна активност в края на процеса на 214-ия час, където се отчита и ниска обща дехидрогеназна активност, отразяваща скоростта на трансформация на субстратите при аеробни процеси.

В процеса на моделната биоремедиация на седиментите е установено, че при натоварване с различните концентрации фенол преобладават групите на аеробните и анаеробните хетеротрофи, нитрифициращите, амонифициращите и фенол-разграждащите микроорганизми. В хода на биодетоксикационния процес анаеробните хетеротрофи, нитрифициращи и амонифициращите бактерии намаляват. Постепенно се увеличава количеството на важните за биоремедиационните процеси представители на родове *Pseudomonas* и *Acinetobacter*.

Изследването на функционалната структура на седиментните микробни съобщества в присъствие на фенол и нанодиаменти показва известно отрицателно въздействие върху количеството на нитрифициращи бактерии, бактерии от род *Pseudomonas* и ендо-бактериите. При останалите функционални групи присъствието на нанодиаменти няма съществен ефект. В следствие на това влияние се наблюдава промяна на доминиращите микробни групи, като в началния етап най-много са представителите на *Acinetobacter* и фенол-разграждащите микроби, а в крайния етап доминират само фенол-разграждащите микроорганизми. При флуоресцентната *in situ* хибридизация (FISH) на микробното седиментно съобщество, основно внимание е обърнато на 48-ия и 214-ия час. Анализът демонстрира, че в началната точка в контролата, към която не са добавяни фенол и нанодиаменти, присъствието на р. *Pseudomonas* не е доминантно. В 48 час флуоресцентният сигнал отразяващ наличието на псевдомонади се засилва на фона на общото количество микроби, като е значително по-силен в пробите без НД. На базата на следващите микроскопски анализи може да се предположи, че НД не подпомагат нарастването на тези видове. Алтернативни са резултатите, отчетени на 214-ия час, където във варианта с НД се наблюдава флуоресценция с висок интензитет, отговаряща на висока плътност на микробното съобщество и по-силен сигнал отразяващ значителното присъствие на р. *Pseudomonas*, т.е. НД способстват запазването на деградационната активност на системата.

По аналогичен начин е проследено и развитието на представителите на р. *Acinetobacter*. Снимковият материал ясно показва доминиращата роля на тези видове в началната точка на развитие на контролата, а пика на това присъствие се постига на 144-ия час във варианта с НД. Очевидна е стимулацията на развитието на бактериите от този род в присъствие на НД. Тези бактерии запазват висок процент на присъствие до края на биодетоксикационния процес.

Резултатите, показват различна доминация на двете основно изследвани групи бактерии в различните контролни точки от процеса на фенолна биодеградация, които са основна причина за способността на микробната система да се адаптира в условия на токсичен шок чрез преструктуриране. Данните, получени чрез FISH-анализ или чрез стандартни култивационни техники съществено се различават, което най-вероятно се дължи на силното присъствие на некултивируеми микроорганизми от р. *Pseudomonas* и р. *Acinetobacter* в хода на деградационния процес.

В следващия раздел от дисертацията е използван флуоресцентен анализ с цел да се оцени разпределението на микроорганизмите и способността им да акумулират полифосфати като индикатор за активно изразходване на резервни източници на енергия като полихидроксибутират (PHB) и полихидроксиацетат (PHA) в моделен фенол-биодетоксикационен процес със и без НД. Тенденцията за по-добро развитие на микрофлората и по-високо количество полифосфати в присъствието на НД се запазва до края на процеса, което доказва способността на системата да усвоява допълнителни източници на енергия и утвърждава НД като важен модулатор, спомагащ за преодоляването на шоките токсични замърсявания.

За постигане на основната цел на дисертацията на базата на получените експериментални данни са изведени корелационни зависимости между редица изследвани параметри и е предложена оригинална схема на ефективен индикаторен апарат за оценка на самопречиствателния потенциал на седиментите във водната екосистема от каскада „Среден Искър“. Аеробната сумарна дехидрогеназна активност, индекса на фосфатна активност и бактериите от р. *Pseudomonas* са изведени като най-подходящи индикатори за бърза диагностика и контрол на самопречистването на седиментите.

Оценено е влиянието на нанодиамантите, като средство за аугментация при фенолната детоксификация на седиментите в яз. Лакатник. Анализът на данните получени при моделните експерименти показва процентните промени на ключовите ензимологични и кинетични показатели и открива нови възможности при управлението на биодеградационния потенциал и повишаване на ефективността на детоксикационните технологии за водните седименти и активни утайки.

Формулирани са алгоритми за управление на биодетоксикационни процеси, извлечени от моделната биоремедиация на седименти замърсени с фенол, при които се отчита влиянието на НД върху ключовите ензимологични, микробиологични и кинетични показатели. Част от създадените алгоритми демонстрират промените в доминиращите групи микроорганизми, изменението на оксигеназните ензми активности, интензивността на токсичния натиск и съответните кинетични параметри.

На базата на флуоресцентният *in situ* хибридизационен анализ е формулиран алгоритъм за управление на риска, чрез комбинирана диагностика и контрол на детоксикацията на ароматни съединения, който обхваща количествените промени в родовете *Pseudomonas* и *Acinetobacter* и натрупването на полифосфати. Използвани са данните за изменението на полу-количествените оценки под модулиращото действие на НД в седиментите на моделна биоремедиация.

В последния раздел на глава „Резултати и обсъждане“ е направен сложен многофакторен анализ на три типа критични ситуации, които според автора „симулират комбинации от рискови събития по замърсяване с ксенобиотици с най-вероятен характер за съответната екосистема“. При всяка от тези ситуации е оценен и аугментираният ефект на НД. Анализът е съобразен с ISO-31000 за управлението на рискови фактори. В резултат са предложени стратегии за биомениджмънт на рискови ситуации, свързани с критични и надкритични шокови замърсявания с фенол. Логиката на използваните индикатори, контролни точки и следене на концентрацията на инхибиторния субстрат може да бъде приложена и при управлението на риска в други екосистеми с потенциал за самопочистване.

В резултат на проведените изследвания и получени резултати са формулираните 15 изводи, разделени в 5 основни групи и 4 основни приноса с оригинален характер, както и 4 - определени като приноси с потвърдителен характер. И изводите и приносите отразяват обективно получените резултати.

В рецензията, представена на вътрешната защита бях отпратила редица забележки и препоръки. При новия прочит на дисертацията, установих, че всичките са взети под внимание и са отразени в коригирания текст. По тази причина нямам допълнителни бележки по същество към официалния и окончателен вариант на дисертацията на Ивайло Йотинов.

Забележките ми носят в известна степен технически характер:

1. На табл. 5.5. в глава „Резултати и обсъждане“ при параметрите за „скорост на биодegradация“ и „специфична скорост на биодegradация“ е обозначена една и съща дименсия. Според съответните формули в гл. ”Материали и методи“ измерителната единица е различна, т.е. при първия параметър не се включва теглото на биомасата. И за двете скорости са получени доста близки стойности. Считам, че е добре да се посочат стойностите, характеризиращи количеството на натрупана биомаса.

2. Не е прието в списъка на литературата към дисертационната разработка да се включват публикуваните в течение на разработката и материали, които са представени и в автореферата. По тази причина съм ги извадила от общия брой представени литературни цитати.

Въпроси:

1. На основата на Вашите резултати и анализи, кой от индикаторите за замърсеност на водата (микробиологични и ензимологични) бихте предпочели да влезе в нормативните документи и правила при осъществяване на бърз контрол на водите и оценка на самопречиствателния им потенциал?
2. Как виждате своето участие в осъществяване на изведените в края на разработката препоръки за развитие на Вашата дейност?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изследванията, включени в настоящия дисертационен труд отразяват реална екологична ситуация от реалната практика в България и поставят ярко предизвикателство в развитието на съвременните биоремедиационни технологии.

От голямо значение са постиженията, свързани с приложението на иновативни нанотехнологични инструменти в аугментационни подходи за биодетоксикация, както и използването на иновационни елементи за биоконтрол и управление (FISH-анализ).

Поставената цел е постигната като са разработени стратегии за биоуправление на рискови ситуации на взривно или акумулативно замърсяване на седиментите в язовирите на каскадата „Среден Искър” с токсични замърсители и са предложени варианти за смекчаване на риска.

На основата на получените резултати докторант Йотинов участва в публикуването на 3 статии в реферирани списания с ИФ, в 2 от които е първи автор; 1 статия в българско списание и 2 статии, публикувани в пълен текст в сборник от международна конференция, проведена в София. Участвал е в 5 национални конференции, 2 от които са с международно участие и 2 международни научни конференции.

Считам, че качеството на представеният ми проект за дисертация ми дава пълно основание да препоръчам докторант Ивайло Йотинов да бъде насочен към процедура за официална защита за придобиване на образователната и научна степен „доктор“.

22.03.2016 г.

доц. д-р Златка Алексиева