

РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационен труд, представен за защита пред научно жури, сформирано със заповед №РД-19-179/28.04.2011 на Ректора на Софийски университет „Св. Климент Охридски“ за получаване на образователната и научна степен “доктор”

Автор на дисертационния труд: Красимира Стоянова Добрева

Тема на дисертационния труд: “Биоразнообразие на арсен-устойчиви и арсен-трансформиращи бактерии, изолирани от замърсени местообитания”

Рецензент: проф. Мария Ангелова дбн

Днешният индустриализиран свят е изправен пред предизвикателството на сериозни екологични проблеми. Един от тях е замърсяването на почвените и водни екосистеми с арсен (As). Наред с природните биогеохимични феномени и антропогенните фактори, причина за високото ниво на арсен, изхвърлянето на индустриални и минни отпадъци силно увеличава неговото съдържание в атмосферата, в почвата и в повърхностните и подпочвените води. От тук токсичният металоид се включва в хранителната верига на животни и хора и води до тежки отравяния и различни заболявания, включително ракови и неврогенни. Детоксикацията на арсен-съдържащите екосистеми предизвиква все по-голям интерес в обществото, което търси способности за намаляване количеството на опасните форми на арсена без натрупването на вредни странични продукти. Биологичните методи за третиране на замърсени с арсен води и почви са тази алтернатива на химическите методи и предлагат именно това важно предимство. Съвременните тенденции в екологията и биотехнологията се характеризират с разработването на технологии на базата на микроорганизми, способни да редуцират или трансформират арсенати и арсенити до техни нетоксични производни. Такъв важен за науката и практиката въпрос е включен в докторската теза на Красимира Добрева. Този въпрос е част от приоритетите на страната и Европа и определя високата степен на актуалност на разработката. Основната насоченост на изследването е да се получи нова информация за биоразнообразието на бактерии, адаптирани към високи концентрации на арсен в замърсени местообитания от околностите на Пловдив и Пирдоп.

Докторантката К. Добрева разработва своята докторантска теза под ръководството на доц. Венета Грудева, която е признат авторитет у нас и в чужбина в

областта на геологичната микробиология и опазването на околната среда. Дисертационният труд е конструиран в традиционна форма със съответните раздели. Написан е на 220 стандартни компютърни страници, които включват 171 страници текст, 14 страници библиографска справка и 45 страници приложения (секвенция на изолирани бактериални щамове). Литературният обзор, изготвен целенасочено и конкретно, с творческо използване на литературните данни, прави впечатление със своята всеобхватност и актуалност. Написан е ясно и включва всички задачи на тезата на базата на общо 232 източника, 231 от които са на латиница и 1 - на кирилица. Над 40% в него са от последните 10 години. Коректно е охарактеризирано състоянието на проблема в световен мащаб, отбелязани са и предхождащите изследвания на колектива, в който работи.

На база на направения в обзора анализ са определени целта и произтичащите от нея задачи. Целта е формулирана конкретно, съответства на насоките в изследването и отразява намеренията на автора да се изолират и охарактеризират арсен-трансформиращи бактерии, като база за използването им в технологии за детоксикация на замърсени с арсен екосистеми. Задачите са конкретни и адекватни на поставената цел.

Разделът “Материали и методи” включва широк набор от методи, които са подбрани целенасочено според изискванията на експеримента. В този раздел трябва да се подчертае следното:

- използвани са съвременни методи от областта на микробиологията, биохимията, молекулната биология и биотехнологията. Съвременен звучене на разработката придават PCR амплификация, 16S рДНК секвениране, RFLP анализ, UPGMA клъстерен анализ, скрининг за арсен устойчиви, арсенат редуктазни и арсенит оксидазни гени, различни видове електрофорези, спектроскопски техники и др.;
- за секвенционните анализи са използвани съответните програмни продукти като напр. GelComrag и програмата BLAST;
- методите са описани прецизно, без излишни подробности. Налага се изводът, че всички експерименти са обмислени професионално, без пренебрегване на детайлите;

- експериментите са проведени със най-съвременна апаратура (включително PCR, автоматично секвенираща техника, Applied Biosystems секвенатор), праймери, китове, ДНК маркери и др.

Раздел „Резултати и обсъждане“ прави отличното впечатление с добре обмисленото и организирано научно изследване, с логическата структура на задачите. Проведена е изключително трудоемка работа и са изолирани и охарактеризирани 245 аеробни и анаеробни хетеротрофни бактерии от замърсени почвени и водни екосистеми в региони на заводите за цветни метали около Пловдив и Пирдоп. Всички изолати са арсен-устойчиви. От тях, използвайки няколко скрининг теста, докторантката селектирани 27, притежаващи способността да трансформират арсена до нетоксични производни. Следвайки логиката на микробиологичното изследване, тя определя таксономичния статус на тези щамове по класическите методи, а след това провежда детайлна молекулярно-генетична идентификация. Тази част от дисертацията се отличава с прецизност, използването на голям брой най-съвременни методи и добре илюстрирани доказателства.

Следващият раздел, в който Добрева насочва вниманието си към подробно охарактеризиране на арсен-трансформация потенциал на изолираните щамове, също включва голям експериментален материал, получен с помощта на подходящи методи и дискутиран на фона на литературните данни. Установени са най-подходящите условия за използването на ново изолираните бактерии за трансформация на арсен. Установен е перспективен щам К6 (*Pseudomonas putida*) за използване в замърсени с арсен екосистеми без наличието на допълнителни енергийни източници, който се отличава и с кратко генерационно време – предпоставка за ефективно и бързо почистване на почви и води.

Много силно впечатление прави работата, свързана с установяване на арсенит-оксидазни и арсенат-редуктазни гени в изолатите от замърсените местообитания. Използвайки съвременни молекулярно-генетични и биоинформатични методи, Добрева доказва наличието на ген, отговорен за синтеза на арсен-устойчив белтък при представители на родовете *Ps. putida*, *Ps. mendocina* и *Alcaligenes faecalis*. В тези експерименти се потвърждава перспективността на избрания в предния раздел щам К6 за използване в бъдещи екологични технологии.

Много подходящ завършек на дисертацията е направеното от докторантката обобщение, в което тя много аналитично и точно представя най-важното от разработката и очертава направените приноси.

Искам да подчертая отличното оформление на дисертацията, стегнатия научен стил, на който е написана, коректното отразяване на резултатите в таблици и фигури, както и тяхното професионално представяне. Богатият експериментален материал е онагледен с 15 таблици и 56 фигури, повечето от които комплексни. Към достоинства на дисертацията отнасям и уменията на авторката да отразява извършеното много ясно и убедително. Освен това, впечатление прави сериозната дискусия, която е възможна благодарение на много доброто познаване на проблема и задълбочената научна разработка.

Наред с изтъкнатите положителни страни, в дисертационния труд на Добрева могат да бъдат направени някои забележки, а именно:

1. Раздел VI, който третира скрининга на гени, кодиращи устойчивост и способност за трансформиране на арсен трябва да предхожда раздел IV – характеристика на устойчивостта и арсен-трансформацията им капацитет, както в подреждането, така и по време на провеждане на експериментите.

2. В литературната справка липсват публикации от последните 1-2 години.

Към докторантката имам и следните въпроси:

1. В резултат на кои механизми на въздействие се е развила установената адаптация към високи концентрации на арсен в изолираните щамове?

2. Като се има пред вид постигнатото в настоящата разработка и нерешените въпроси по проблема, в каква насока трябва да бъдат насочени бъдещите изследвания?

Посочените забележки не намаляват стойността на дисертацията. Отбелязвам ги с презумпцията да бъде полезна за бъдещата работа на Красимира Добрева. Още повече, че извършените изследвания дават възможност да се открият сериозни теоретични и приложни приноси, както оригинални, така и потвърдителни. По същество, те се отнасят до следното:

1. За първи път е проучено биорознообразието на микрофлората в български екосистеми, замърсени с арсен, което е принос към екологичната характеристика на районите в страната.

2. Идентифицирани са бактерии от род *Pseudomonas* и *Alcaligenes* и е потвърдена способността им да трансформират арсен.

3. Създадена е богата колекция от арсен-трансформиращи бактерии, охарактеризирани със съвременни методи, които са основа разработването на биотехнологии за пречистване на почвени и водни екосистеми.

4. Разработена е схема от молекулно-генетични методи за идентификация на арсен-трансформиращи бактерии от родовете *Pseudomonas*, *Azoarcus*, *Thauera* и *Alcaligenes*.

5. За първи път е установена арсен-трансформираща способност в бактерии, принадлежащи към видовете *Ps. mendocina*, *Ps. fulva* и *Ps. stutzeri*.

6. Доказана е възможността за използването на праймери за амплификация на арсен-трансформиращи гени като биомаркери за идентификация на замърсявания с арсен.

7. Получена е нова информация за наличието на ген, кодиращ синтеза на арсен-устойчив белтък в генома на бактерии от видовете *Ps. stutzeri*, *Ps. mendocina* и *Al. faecalis*.

8. Създадена е база данни за използването на арсен-трансформиращи бактерии в екологични разработки.

9. Селектиониран е щам *Ps. putida*, перспективен за разработването на биотехнологии за бърза и ефикасно пречистване на почвени и водни екосистеми, замърсени с арсен.

Данните, представени в дисертацията са включени в 6 журнални научни статии, които са отпечатани в международни списания - *Biotechnology & Biotechnological Equipment* и *Advanced Material Research*). Общият IF е 0.720. В 4 от тях докторантката е първи автор. Това ми дава основание да считам, че резултатите главно са нейно лично дело и са получили международно признание. Освен това, Добрева е участвала с части от разработката на 6 научни форума.

В заключение искам да подчертая, че материалът е дисертабилен, темата е актуална, докторантката е усвоила съвременни методи, експериментите са поставени

методично правилно, получените резултати са достоверни и са солидна база за следващи научни и приложни разработки, открояват се оригинални научни и приложни приноси.

Въз основа на направения разбор, при който са изтъкнати както положителните страни, а така също и някои пропуски в представянето на материала, предлагам на уважаемите членове на Научното жури, сформирано със заповед №РД-19-179/28.04.2011 на Ректора на Софийски университет „Св. Климент Охридски” да присъдят на Красимира Стоянова Добрева образователната и научна степен “доктор”.

31. 05. 2011 г

София

Рецензент:.....

/проф. М. Ангелова д.б.н./