

РЕЦЕНЗИЯ

от доц. д-р Пенка Ангелова Мончева
Софийски университет „Св. Кл. Охридски”
на дисертационен труд на тема:
„Биоразнообразие на арсен-резистентни и арсен-трансформиращи бактерии
Докторант: Красимира Стоянова Добрева
Научен ръководител: доц. д-р Венета Грудева

1. Актуалност и значимост на дисертационната тема

Проблемите, свързани със замърсяването на околната среда и търсенето на начини за нейното очистване са винаги актуални и предполагат провеждането на изследвания не само с приложен, но и с фундаментален характер. Замърсителите на околната среда са множество органични и неорганични вещества, които имат различен ефект. Един от сериозните замърсители е арсенът и неговите съединения. Продължителното излагане на високи концентрации на арсен-съдържащи съединения води до появата на различни по степен на сложност здравословни проблеми. В смисъла на посоченото определям темата на дисертационния труд като много актуална, интересна и с екологично значение.

2. Оценка на структура на дисертационния труд

Дисертационният труд е построен по общоприетия за този вид научни трудове модел, като е съставен от 10 раздела: Увод (2 стр.), Литературен обзор (42 стр.), Цел и задачи (1 стр.), Материали и методи (25 стр.), Резултати и обсъждане (90 стр.), Обобщение (6 стр.), Изводи (2 стр.), Приноси (2 стр.), Списък на използваната литература (съдържа 232 източника и Приложение (33 стр.). Общият обем на труда, без приложението е 185 стандартни А4 формат страници.

2.1. Литературен обзор

Обемът на литературния обзор не надхвърля препоръчителната 1/3 от общия обем на дисертацията. Тази част на дисертацията разкрива теоретичните познания на докторанта, като показва неговата осведоменост по разработвания проблем. Структуриран е в няколко раздела. Избран е подходящ модел за тяхното представяне. Първият раздел включва разглеждането на биогеохимичния цикъл на арсена, характеристиката на елемента арсен, разпространението му в природата, и приложенията му в различни сфери. Следващият раздел разглежда основните форми (неорганични и органични) на арсена, трансформациите им в природата. Третия раздел е посветен на бионаличността и токсичността на арсена. Четвърти раздел дискутира кръговрата на арсена и механизмите

на неговите трансформации (окисление и редукция) с участието на бактерии. Следващият раздел засяга методите, прилагани за идентификация на арсен-трансформиращите бактерии. Литературният обзор завършва с проследяване на замърсяването на околната среда с арсен, както в световен мащаб, така и за България, което е логичен завършек на литературния обзор и в същото време аргументация за поставената цел на дисертационния труд. Считам, че литературният обзор е изчерпателен, последователен, съответстващ напълно на темата на дисертационния труд, целенасочен, построен върху солидни литературни източници. Това е дало възможност проблемът да се проследи от неговото възникване до момента. Докторантът се е позовал на 232 литературни източника, информацията от които е разгледана критично, аналитично и обобщено, което показва теоретична зрялост. Написан е на много хубав научен стил, граматически издържано. Приблизително 42% от цитираните литературни източници са от периода 2000-2009 г., което потвърждава актуалността на работата. Считам, че тази част от дисертационния труд представя докторанта в много добра светлина и показва придобитите в хода на докторантурата умения за работа с научна литература и много добра теоретична подготовка, която е предпоставка за успешна експериментална работа.

2.2. Цел и задачи

Целта на дисертацията е поставена ясно, като за нейното постигане докторантът е поставил шест ясно дефинирани задачи. Считам, че задачите са добре обвързани с целта и с тяхното изпълнение тя ще бъде постигната

2.3. Материали и методи

В този раздел прецизно са описани всички използвани в работата материали, както и подобрите методи за изпълнението на задачите. Подбран е набор от класически и съвременни микробиологични, аналитични и молекулярно-биологични методи. Считам, че методите са подходящо избрани и дават възможност за изпълнение на задачите и получаване на възпроизводими резултати. Разнообразието от методи показва много добра методична подготовка на докторанта постигната в хода на изпълнение на дисертацията.

2.4. Резултати и обсъждане

Резултатите правилно са представени и обсъдени по реда на поставените задачи, което улеснява читателя и показва уменията на докторанта да оформя и представя резултатите логично и последователно. Чрез 15 таблици и 38 фигури са илюстрирани основните резултати, получени от Красимира Добрева. След изолирането на огромен брой щамове, способни да се развиват в присъствие на арсен докторантът отбира 27, които показват способност да трансформират арсена -15 окисляват арсенита до арсенат, а 12 редуцират арсената до арсенит. Чрез прилагането на комбинация от класически и

молекулни методи щамовете са подложени на идентификация. Приложени са техниките – RFLP анализ на 16S рДНК чрез две ендонуклеази, RFLP анализ на ITS фрагментите с три ендонуклеази, както и секвениране на амплифицирания 16S рДНК фрагмент. На базата на проведените анализи са идентифицирани 9 вида – 7 принадлежащи към род *Pseudomonas*, един към род *Achromobacter* и един към род *Thauera*. Представени са резултатите от изследване на устойчивостта на щамовете към арсенови съединения и трансформационния им капацитет. Направен е скрининг сред щамовете за арсен-устойчиви, арсенит-оксидазни и арсенат-редуктазни гени със специфични праймери.

2.5. Изводи и приноси

Въз основа на експерименталната работа и получените резултати докторантката прави 9 извода. Те са свързани с получените резултати и логично произтичат от тях.

Дисертационният труд има както теоретични, така и приложни приноси, които ще коментирам така:

С теоретичен и оригинален характер са приноси 3, 4, 7 и 8 чрез които се предоставят нови неизвестни до момента в литературата данни за физиологичните и биохимични особености на *Pseudomonas plecoglossicida*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas fulfa*, *Pseudomonas stutzeri*, *Ps. putida*, както и за генетичните характеристики на *Ps. stutzeri*, *Ps. mendocina* и *Alcaligenes faecalis*. Принос 2 има потвърдителен характер.

Един от приносите (принос 6) има методичен характер и би могъл да се използва и от други автори.

Останалите приноси (1 и 8) имат приложен характер. Създадена е колекция от идентифицирани и добре характеризирани арсен-трансформиращи бактериални щамове, която може да послужи като основа при разработването на стратегии за отстраняването на арсен от околната среда.

Струва ми се, че принос 5 би могъл да отпадне.

3. Участие на докторанта в изработването на дисертацията

Свидетел съм на упорития труд на докторанта, който бе положен в продължение на 4 години. Резултатите са получени след провеждането на значителна по обем експериментална работа дело на самия докторант.

4. Препоръки, забележки и въпроси

Към раздел Материали и методи

- Твърде подробното описание на приготвянето на хранителни среди би могло да се избегне
- Контролирането на чистотата на бактериална култура, чрез използването микроскопски препарати е прието да се нарича „микроскопски” контрол, а не „визуален”.
- Въпреки че е евтин и достъпен, считам че Полимикротест 20 не е най-подходящ за характеризирането на изолати с предполагаема принадлежност към семейство, различно от *Enterobacteriaceae*.

Към раздел Резултати и обсъждане

- Бих препоръчала в бъдещи изследвания с подобен характер включването в изследванията и на референтни култури при молекулните анализи, които ще помогнат и подкрепят заключенията, които се правят.
- При анализиране на дендрограмите от молекулните анализи считам за правилно да се посочва процентът на сходство, при който се формират разискваните от Вас групи.
- Считам за правилно да се говори за вътревидово разнообразие само тогава, когато се работи с вече идентифицирани към даден таксон (вид) щамове. Не считам за коректно в таблицата 14 изписването на процентите идентичност срещу щамове, които не са секвенирани, независимо, че принадлежат към кластери, към които принадлежат и секвенираните щамове.

Към докторанта имам следните въпроси:

1. На базата на какви резултати се прави част от извод 1, че е формирано стабилно съобщество. Кои са признаците, които го определят като стабилно?
2. По какъв начин начин арсенът стимулира растежа на някои щамове?
3. В извод 7 посочвате вида *Alcaligenes faecalis*, а в таблицата за резултатите от секвенирането, посочвате, че видът принадлежи към род *Achromobacter*. Синоними ли са *Alcaligenes faecalis* и *Achromobacter faecalis*?

5. Публикации във връзка с дисертационния труд

Докторантът е представил списък на научните публикации и участия в научни форуми, свързани с темата на дисертационния труд.

Докторантът има шест излезли от печат научни публикации, на 4 от които е първи автор, което показва водещата му роля в изработването на експерименталната част. Пет от публикациите са в международни журналы и една в български журнал. Едната публикация е публикувана в списание с импакт фактор за 2009 (0.291). Красимира Добрева има 8 участия в научни форуми – 6, в национални и 2 в международни.

В периода на докторантурата Красимира Добрева е участвала в седем научни проекта. Пет от тях са финансирани от Националния фонд за научни изследвания към МОНМ и два от Фонда за научни изследвания на СУ „Св. Кл. Охридски”

6. Автореферат

Авторефератът е изготвен по модела, по който е изработена дисертацията като в съкратен вид са представени най-важните неща от всички раздели (без литературния обзор). Информацията, включена в автореферата вярно отразява онази, съдържаща се в дисертационния труд.

7. Придобита компетентност и съответствие с изискванията на образователната и научна степен „доктор”

В хода на изпълнението на експерименталната работа и оформянето на дисертационния труд докторант Красимира Добрева е придобила компетенции и умения, които могат да бъдат групирани по следния начин:

- разширила е своята теоретична компетентност в областта на микробиологията и по-специално в разбирането на механизмите чрез, които микроорганизмите участват в процесите на трансформация на арсенови съединения в природата и свързани с това допълнителни знания

- придобила е умения да работи с научна литература, да анализира и обобщава данни, както и да ги използва умело при коментара на получените от нея резултати.

- надградила е методичната си подготовка, чрез умелия избор на молекулни методи и тяхното прилагане при решаването на конкретни задачи, свързани с изпълнението на дисертационната тема

- придобила е умения самостоятелно да оформя и дискутира резултатите от своя труд, да прави изводи на базата на тях.

Всичко това ми дава основание да смятам, че тя е придобила компетенции и умения, които напълно съответстват на образователната и научна степен „доктор”.

8. Заключение

Изработването и оформянето на дисертационния труд, включващо представянето на резултатите, тяхното дискутиране, илюстративния материал ми дават основание да смятам, че в процеса на докторантурата Красимира Добрева е придобила теоретични знания и практически умения напълно съответстващи на тези за третата степен на обучение в Софийски университет „Св. Кл. Охридски”. Извършено е мащабно изследване на съвременно ниво, съчетаващо класическите методи на микробиологията с молекулно-биологични. Много добрата теоретична подготовка е дала възможност на докторантката да подбере широк набор от методи, които осигуряват изпълнение на поставените задачи, с което е постигната целта. Смятам, че обемът на този труд е внушителен, направени са много анализи, а резултатите са оформени по много добър начин. Анализите са дело на докторантката, от която имам и лични впечатления. Направените от мен забележки са дребни, имат повече технически характер и биха могли да бъдат полезни за бъдещата работа на докторанта.

Въз основа на гореизложеното, както и предвид Правилника за приложение на закона за развитие на академични състав в Република България и този на СУ „Св. Кл. Охридски” считам, че настоящият труд отговаря на изискванията за докторска дисертация и го оценявам положително като препоръчвам на Научното жури да присъди образователната и научна степен „доктор” по научната специалност Микробиология шифър 06.01.12. на г-жа Красимира Стоянова Добрева.

06.06.2011 г.

София

Подпис:

(доц. д-р П. Мончева)