

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд на тема: „**Характеристика на микробиома при комплексно изследване на фини прахови частици (ФПЧ) в атмосферата на урбанизирани градски райони и оценка на риска**“, представен за придобиване на образователната и научна степен „**Доктор**“ по докторска програма „**Микробиология**“, в професионално направление **4.3. Биологически науки** на докторант на свободна подготовка **Боянка Николаева Ангелова** към катедра „Обща и промишлена микробиология“ в Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски“ - София

Рецензент: проф. д-р Елена Иванова Георгиева – ИФРГ-БАН

Постоянно нарастващите изисквания на съвременното общество за по-точни и надеждни резултати за опазването на околната среда и здравето на населението не само в България, но и в света, както и за подобряване на времето, качеството на въздуха и климата налагат нуждата от усъвършенстване на използваните методи за комплексен мониторинг на замърсеността на атмосферата, особено при сложни терени, където е съсредоточена по-голямата част от населението. Нова тенденция за комплексни мониторингови проучвания на въздуха има за цел да проследи присъствието не само на физични и химични замърсители, а също състава и концентрацията на микроорганизмите в силно урбанизирани райони. Интересът към микроорганизмите, откривани във въздуха, се е зародил още от времето на Дарвин и Пастър. Например, в края на 19 век е констатирано, че концентрацията на спори във въздуха над определени места във Франция е по-висока и смъртността нараства, при повишаване на концентрацията на микроорганизми във въздуха. Микробиалната биоаерозолна контаминация на въздуха е изследвана в много държави, но разнообразието, разпространението и взаимодействията на тези микроорганизми са слабо изяснени, въпреки, че те са постоянен елемент от въздушното пространство. Установява се, че въздухът е пълен с живот, подобно на почвата и водата и е местообитание за огромно разнообразие от микроорганизми, принадлежащи към различни таксономични групи, някои от които все още не са описани, поради трудности да бъдат култивирани в лабораторни условия. Независимо от технологичния и методологичен напредък, към момента не са провеждани пълномасщабни мониторингови проучвания относно динамиката на микробиалната биоаерозолна контаминация във въздуха на град София, където големи части от града са подложени на източници на силно атмосферно замърсяване поради ускорените урбанизационни темпове на развитие.

Тезата, разработвана в дисертационният труд на Боянка Ангелова е фокусирана върху важен проблем, с фундаментална и практическа насоченост, свързан с екологичните

проблеми на гр. София. В столицата ни е съсредоточена голяма част от населението на България, както и промишлеността, транспорта, производството на енергия и др., разработваните задачи в този научен труд включват комплексно изследване върху абиотичното и биоаерозолно замърсяване на въздуха в силно урбанизираната централна част на града. Тъй като от скоро фините прахови частици се считат за канцерогени, такова изследване е изключително актуално, а резултатите от замърсената атмосфера над гр. София, могат да имат принос за превенция от болести и подобряване на човешкото здраве, да бъдат използвани при изготвянето на бъдещи препоръки за предотвратяване на кризисни ситуации, както и да помогнат при вземането на правилни управленчески решения за опазване чистота на града. Разработваната дисертация е навременна и в тясно съответствие със стандартите на Европейския зелен пакт на ЕС и с препоръките на Световната Здравна Организация.

Представеният ми за рецензия научен труд е написан на 300 страници, според приетите стандарти за придобиване на образователната и научна степен „Доктор”, и съдържа: Увод, Литературен обзор, Цели и задачи, Материали и методи, Резултати и обсъждане, Изводи, Приноси и Препоръки, както и списък на участия в научни прояви и публикации. Използваните литературни източници са 641 заглавия на латиница и 1 на кирилица и са отразени на 38 страници. Представеният материал е богато онагледен със 112 информативни фигури и 44 таблици. Много добро впечатление прави дадените препоръки към органите на властта за въвеждането на регулярен микробиологичен мониторинг, който ще позволи да се отчитат промените настъпващи с времето. Публикуваните данни от настоящата дисертация могат да послужат и за сравнение при последващи мониторингови проучвания на въздуха в град София.

Темата и съдържанието на дисертационния труд напълно покриват обявената номенклатурна специалност по професионално направление 4.3 Биологични науки, Научна специалност “Микробиология” за присъждане на ОНС “доктор”.

Съществени части от получените резултати от дисертационния труд са намерили отражение в 5 научни статии, две от които са публикувани в реферирани списания по Scopus и Web of Science с квартили **Q2** и **SJR 0.244**. В две от публикациите Ангелова е на първо място, а в останалите е на трета, четвърта и пета позиция. Докторантката е представила списък с 8 участия с постери и секционни доклади на национални и международни форуми, както и участия в три научни проекта.

Литературният обзор е написан на 64 страници компетентно с висок научен потенциал, показващ дълбочината и мащабността на този проблем, както и на извършената в последствие експериментална работа. Той заема приблизително една четвърт от цялостната работа. Написан е на изключително добър научен език, обхваща в контролирана последователност публикуваната литература, чете се и осмисля с лекота. В него са обсъдени над 600 литературни източници и данни имащи пряко отношение към изследванията от развитието на научния проблем в световен мащаб. Професионално са отразени исторически данни за замърсеността на въздуха. С вещина и в детайли са описани всички мониторингови изследвания върху състава и количеството на микроорганизмите във въздуха; източниците, разпространението и състава на биоаерозолите; транспорта и трансформациите на биоаерозолите; стандартите за качеството на атмосферния въздух; методите за събиране на биоаерозоли и подходите за изучаването им. С фигури са онагледени гражданските мрежи за следене на качеството на въздуха. Обсъдени са възможностите и предимствата на метагеномен и количествен PCR анализи за изучаване на биоаерозолите във въздуха. Видно е, че докторантката познава много добре състоянието на проблема и го представя задълбочено и изчерпателно. Ускорените урбанизационни темпове на развитие на град София, са причина и налагат нуждата от задълбочени изследвания свързани с комплексния характер за формирането на общата замърсеност на атмосферата. Оценката на замърсеността на въздуха в различни ситуации и места представлява интерес както от научна, така и от практическа гледна точка. На тези важни екологични проблеми е посветена темата на този научен труд и с голямо удовлетворение мога да кажа, че получените резултати ще бъдат не само основа за общи инициативи и сътрудничества, но и вземане на информирани решения за подобряване на въздуха в столицата ни.

В раздела „Цел и Задачи” ясно и конкретно е формулиран основният проблем на дисертационния труд, а именно: осъществяване на комплексно изследване на въздушната микробиота в силно урбанизирана централна част на град София и провеждане на целогодишен количествен мониторинг върху нивата на биоаерозолната контаминация в подбрана локация, идентифициране на доминиращите микробни видове и пълно охарактеризиране на асоциираното прахово замърсяване.

За постигане на поставената цел спомага изпълнението на една основна задача: провеждане на пълномащабно целогодишно проучване за периода Май, 2020 -Април, 2021 върху количествената динамика на култивируемата бактериална и фунгиална

биоаерозолна контаминация в избрана локация от централната градска част на град София. Успешното изпълнение на тази задача е постигнато с решаването на 5 добре осмислени, конкретно формулирани и логично следващи задачи, изцяло свързани с опазване качеството на въздуха в гъсто населен столичен район. Трябва да отбележа, че така поставените задачи покриват и дори надхвърлят обема на една докторска работа.

В раздела „Материали“, от частта „Материали и методи“, обектът на изследване е огромен, а именно: микробната биоаерозолна контаминация и праховото замърсяване във въздуха над силно урбанизираната централна част на град София с местонахождение бул. Драган Цанков 8 и GPS координати: 42°41'01.9"N, 23°19'58.3"E.

Широкият спектър от класически микробиологични, генетични, физико химични, молекулярни, микроскопски, клетъчно-биологични и статистически методи на използваните методи, както и компетентното им описание потвърждава впечатлението ми за отличната теоретична и експериментална подготовка на докторантката. За период от 54 седмици, с начало месец май 2020 г. и край – месец април 2021 г. Боянка Ангелова използвайки трудоемки методи е извършила качествен и количествен анализ на биоаерозолното присъствие. За качествен анализ на биоаерозолното присъствие докторантката е изследвала 248 чисти бактериални и 35 чисти фунгиални култури, изолирани от 324 проби, а обект на извършения от нея количествен анализ е общият брой хетеротрофни бактерии и плесенни гъби. Тези анализи са изпълнени по класическата схема за идентификация на бактерии и фунги. За проследяване на дневния ход в динамиката на микробното въздушно замърсяване са подбрани 4 дни, принадлежащи към четирите годишни сезона в опробвания период: пролет-лято-есен-зима. За събиране на биоаерозоли от въздуха и количественото им определяне е използван шест степенен каскаден импактор на Андерсен. Чрез секвениционен анализ от ново поколение (NGS [*Next-Generation Sequencing*]) на изолирана ДНК от две проби, събрани през топлата и студена част от годината, е направена точна оценка на резултатите на биоаерозолното присъствие. Секвенирането и био-информатичния анализ на получените секвенции е извършено от Novogene Company Ltd (UK). Основната част от изследванията са фокусирани върху микробиологичния мониторинг на биоаерозолното замърсяване, но за по-доброто теоретично разбиране и бъдещо практическо приложение на резултатите, докторантката е извършила и физикохимично характеризирание на ФПЧ (Фини Прахови Частици), осъществено в Института по Катализ на БАН. За тези изследвания са използвани съвременни апарати за висококачествени измервания като рентгено-фазов и

рентгено-структурен анализ, сканиращ електронен микроскоп, анализатор за размер на частици и много други, с които докторантката се е запознала.

Един от най-важните раздели за оценка нивото на получените резултати е раздела „Резултати и обсъждане“. Кандидатката е получила множество доказателствени данни от поставените за разрешаване задачи, които са показани в представителни фигури и таблици. Първата изпълнена задача е количествен анализ на култивируемата микробиота откривана във въздуха на избраната локация. Установена е динамиката в нивата на бактериалните и фунгиални биоаерозоли във въздуха на избраната локация за всеки един месец от обследваната пълна календарна година. Данните са показали изразена месечна динамика в нивата на проследяваните биоаерозоли, която е обусловена от географските и климатични особености на град София.

Регистрираните максимуми за бактериалната контаминация (май, 2020; юли 2020 и септември 2020) и фунгиалната контаминация (юни, 2020; юли 2020 и октомври 2020) не съвпадат напълно по време с първият пик на отчетени максимални стойности на праховото замърсяване през ноември и декември, 2020. Частично припокриване е наблюдавано в началото на отбелязано повишение в концентрацията на праховото замърсяване - м. октомври, а през февруари и март, поради неблагоприятните стойности на абиотичните фактори температура, влажност и др., са отчетени сравнително ниски нива в стойностите на праховото замърсяване.

Получените резултати от годишния мониторинг върху нивата на откриваната във въздуха на изследваната локация за биоаерозолна контаминация доказват, че годишната динамика в числеността на проследяваната бактериална и фунгиална биоаерозолна компонента е изключително динамична и е отражение на спецификите в географските и климатични характеристики на град София. Пикови стойности за фунгиална контаминация са отчетени в месеците юни, 2020; юли 2020 и октомври 2020, (1181.0 CFU/m³; 1482.0 CFU/m³ и 1491.0 CFU/m³). Ниски нива в количествения дял на фунгите са отчетени през месеците декември, 2020, януари 2021 и февруари, 2021 г., респ. 16.0 CFU/m³; 20.0 CFU/m³ и 31.0 CFU/m³. Бактериалната контаминация регистрира максимални стойности през месеците май 2020; юли 2020 и септември 2020, (401.0 CFU/m³, 495.0 CFU/m³ и 379.0 CFU/m³). Минимални нива на бактериална контаминация във въздуха на изследваната локация са отчетени през месеците януари и февруари, 2021г., съответно 58.0 CFU/m³ и 25.0 CFU/m³.

Резултатите от мониторинга върху дневният ход в нивата на откриваната във въздуха на локацията биоаерозолна контаминация са показали, че концентрациите на изследваните биоаерозоли се променят часово, в пряка връзка с абиотичните параметри на средата и отразяват цикличността на антропогенния натиск в локацията. Дневната кинетика е с подчертано сезонен характер, обусловен от типичните за всеки сезон климатични фактори, както и активностите на населението.

Данните от мониторинга върху седмичния ход в нивата на откриваната във въздуха на локацията биоаерозолна контаминация показват, че седмичната динамика в концентрациите на изследваните биоаерозоли, независимо от сезона, е обусловена до голяма степен от антропогенните дейности – покачване в стойностите в началото на работните дни, достигане на максимални стойности в средата на седмицата и редукция към края на работната седмица. В последния работен ден и първия от почивните дни е наблюдаван вторичен пик в дневната концентрация.

Таксономичните анализи на култивируемата бактериална микробиота във въздуха на локацията са показали, че доминиращите бактериални изолати принадлежат към 25 рода, като най-много изолати са отнесени към родовете *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Enterobacter* и *Paracoccus*. Фунгиалното присъствие във въздуха на локацията е със значително по-слабо изразен таксономичен диверситет. Изолатите са отнесени към четири рода на отдел *Ascomycota* – *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria* и *Cladosporium*.

С резултатите от проведеният метагеномен анализ, докторантката разкрива изключително висок таксономичен диверситет в изследваните проби – намерени са представители на филумите *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroides*, *Actinobacteria*, *Cyanobacteria*, *Ascomycota* и *Basidiomycota*.

Следващата задача изпълнена от докторантката са физикохимични анализи на ФПЧ. Тя установява, че фините прахови частици не са стабилни, нямат постоянен състав и размер и химическата им природа може да бъде модифицирана от различни физикохимични процеси. Въпреки че някои частици попадат директно в атмосферата от естествени и антропогенни аерозоли, голям брой от тях се образуват вторично в атмосферата. Събраните ФПЧ са предимно агрегати от твърдо ядро и течна повърхност. Агрегатите са съставени от малки частици, включително такива с нанометрични размери. Повишеното прахово съдържание (ФПЧ10/2.5) във въздуха е свързано с повишаване на микробното присъствие, докато валежите от дъжд и сняг водят до неговата редукция.

Получените данни от това мащабно изследване са показали, че докато пиковете на замърсяването с ФПЧ са свързани предимно с повишаване на автомобилния трафик, промишлеността и отоплението, промяната в количествения и качествен състав на микробиота е сезонна. Изследването на морфологията на ФПЧ в района на локацията доказва, че техният вид и концентрация са сезонно зависими. Повече от 18% от частиците са агрегати от множество малки частици, включително такива в нанометричната скала.

По отношение на химичния състав на установеното прахово замърсяване (ФПЧ10/2.5) във въздуха на района, основните фази са силикатни, алумосиликатни и сулфатни съединения, както и органични и неорганични (карбонатни и въглищни) въглеродни фази. Регистрирано е и високо съдържание на желязни оксиди.

В заключение от този раздел мога да обобщя, че са използвани огромен брой микробиологични материали, адекватни контроли и брой експерименти, с което е постигната висока достоверност при статистическата обработка на резултатите. Надеждността и достоверността на получените резултати са валидизирани с надлежно документирано, високо информативни и представителни фигури и таблици. Получена е информация относно дневната, седмична, месечна и годишна динамика на микробното биоаерозолно замърсяване на въздуха на гр. София, както и информация за таксономичния диверзитет на въздушната микробна контаминация, като са определени доминиращите бактериални и фунгиални таксони. Осъществено е първото по рода си в национален мащаб комплексно изследване на фини прахови частици в атмосферата чрез лидарно локализиране на време-пространственото им разпределение, характеризирани по състав, структура, и морфология.

Получените данни са съществен принос за разработването на стратегия за контрол и оценка на замърсяването на въздуха на територията на град София.

Една част от получените научни данни са намерили отражение в 5 публикации, 2 от тях са в индексирани списания и 8 престижни международни и национални научни форуми. Докторантката участва в разработките на 3 научни проекта. Приемам представените и аналитично аргументирани от докторантката 14 основни изводи, 7 приноси и 3 препоръки. Резултатите в дисертацията на Ангелова са предпоставка за бъдещи разширени проучвания в областта.

Авторефератът е изготвен съгласно изискванията и правилно отразява изложението на дисертационния труд и формулираните изводи и приноси.

Заключение: Боянка Ангелова е извършила мащабни изследвания. От вложеният огромен труд и изпълнени многобройни експерименти със съвременна методология тя е получила важни резултати и е направила опити за тяхната оценка и интерпретация в рамките на съществуващите хипотези. Дисертационният труд е актуален, с ясни цели и задачи, със значими изводи и постижения и има безспорни научни и научно-приложни приноси. Определянето на пространствено времевата променливост на характеристиките на бактериалната и фунгална микробиота, както и на ФПЧ, изисква провеждане на висококачествени дългосрочни измервания от отлично подготвен специалист. Тези процеси се отличават с голяма сложност и изключителна разнообразност в условията на сложен терен в пренаселена градска среда. От всичко изложено определено считам, че Боянка Ангелова е със задълбочени познания, не само в микробиологията, но и в молекулярната и класическа генетика и показва способности за осъществяване на самостоятелни идеи. Дисертационният труд на Боянка Ангелова отговаря напълно на изискванията на ЗРАСРБ и Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и за заемане на академични длъжности в БФ на СУ „Кл. Охридски“. Имайки предвид професионалните качества и научните постижения на докторантката, убедено препоръчвам на научното жури да присъди на Боянка Ангелова образователната и научна степен **“Доктор”**.

Рецензент:

/проф. д-р Елена Георгиева