

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертация на тема:

„Биодеградация на ароматни и алифатни ксенобиотици от свободни и имобилизирани бактериални клетки“

Автор: ас. Лиляна Начева

Научен ръководител: доц. д-р. Людмила Кабаиванова

Рецензент: доц. д-р Златка Алексиева

Настоящата дисертационна разработка на докторант на самостоятелна подготовка - ас. Лиляна Начева е представена за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“ в професионално направление 4.3. Природни науки, научна специалност Микробиология. Трудът е структуриран в 9 глави и следва възприетите стандарти за дисертация. Написан е на 114 страници и е много добре илюстриран със 7 схеми, 4 таблици и 46 фигури, повечето от които демонстрират получените резултати. Списъкът на използваната и цитирана научна литература включва 181 източника, от които 3 на кирилица, останалите на латиница. Трябва да се отбележи, че 22% от цитираните материали са публикувани след 2015 г. Това несъмнено отразява широкият интерес и актуалност на проблемите, разглеждани в дисертацията на Лиляна Начева.

Отдавна е известно, че биотехнологиите, базирани на микробни щамове, способни да усвояват и унищожават вредни замърсители, са успешен и рентабилен начин за решаване на някои от най-важните проблеми, свързани с чистата околна среда. Микробният капацитет за разграждане на голямо разнообразие от ксенобиотици провокира усилията на изследователите по целия свят, да проучат повече възможности за разработване на технологии за биоремедиация. Полагат се много усилия за постигане на ефективно микробно утилизиране на широко разпространени химични съединения в околната среда, като ароматни и полиароматни съединения, увреждащи здравето на хората и другите живи организми.

Настоящата разработка е посветена на способността на свободни и имобилизирани клетки на избрани бактерии от родове *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* и др. да разграждат ароматни и алифатни замърсители на околната среда.

В Уводът се разкриват в синтезиран вид сериозните проблеми на замърсяването на околната среда в глобален и национален план и се прави ясна обосновка на

актуалността и значимостта на изследванията, на които е посветена представената разработка.

Литературния обзор обхваща научните постижения в областта на биодegradацията на ксенобиотици, като акцентът е върху значението на микроорганизмите върху широк кръг ароматни и алифатни съединения. Сериозно внимание е отделено на физичните, химични и биологични фактори въздействащи върху биодegradационните процеси. Представени са катаболитните схеми за разграждането на фенола, като основен представител на ароматните съединения, както и алифатните съединения - n-алкани в прокариотни и еукариотни микроорганизми. Изтъкната е ролята на биосърфактантите в усвояването на въглеродороди. Съществено влияние е отделено на методите за имобилизация на микробни клетки, като подход за увеличаване на ефективността им в схемите за биотехнологично премахване на токсичните органични замърсители.

Към ясно формулираната основна цел да се проучи способността на микробни видове в свободна и имобилизирана форма за биодegradация на алифатни и ароматни ксенобиотици са формулирани 6 основни задачи, които ясно очертават акцентите на дисертацията, а именно да се изследват фенол разграждащата активност и адаптационните способности на свободни и имобилизирани клетки на избрани щамове бактерии от родовете, изброени по-горе, както и участието им в биоремедиация на води и почви. Оптимизиране на условията на полунепрекъснат процес при многократно подаване на ксенобиотик; избор на най-ефективния подход за имобилизация и многократно използване на подбраните имобилизирани препарати. Анализ на потенциала на избраните щамове за едновременно разграждане на алифатни и ароматни (хидрофобни и хидрофилни) съединения при участие на свободни и имобилизирани клетки, както и проследяване на активността им за продукция на биосърфактанти и ролята им в процеса на биодegradация.

Глава Материали и Методи е представена в 8 части, в които са представени класически и съвременни подходи за анализ, използвани в хода на разработката. Най-подробно са описани методите за подготовка на носители и имобилизация на клетки. Използването всички описани методи за разработката на настоящата дисертация характеризира докторантката като високо квалифициран експериментатор с мултидисциплинарен арсенал за изследователска дейност.

В глава Резултати са представени значителни по обем данни за биодegradационният потенциал на свободни и имобилизирани клетки на щамове

Rhodococcus wratislawiensis BN38 и *Nocardia farcinica* BN26 по отношение на фенол и п-хексадекан, като единствени източници на въглерод в хранителната среда. Експериментите са проведени в условията на полунепрекъснато култивиране. Изследвано е влиянието на различното време за адаптация при различна начална плътност и концентрация на фенол. Доказана е значителната активност на изследваните щамове при усвояване на фенол и п-хексадекан. Отчетена е значително повишената ефективност на усвояването им при имобилизацията на клетките на щам *Rh. wratislawiensis* BN38. При имобилизирани клетки на щам *Nocardia farcinica* BN26 е отчетено понижаване на времето за активното им усвояване.

От значителен интерес са резултатите получени от аналогичните експерименти проведени за анализ на съвместната биодеградация на фенол и п-хексадекан. Разкрит е значителният потенциал на щам *Rh. wratislawiensis* BN38 да осъществява разграждане на двете съединения с практически еднаква сумарна степен на усвояване на ксенобиотиците. Само фенол – 11 g/l в рамките на 22 цикъла. Съвместно фенол+ п-хексадекан – 8+2.4+ 10.4 g/l, в рамките на 16 цикъла. Щам *N. farcinica* BN26 също осъществява съвместното разграждане на двете съединения, но със значително по-ниска ефективност. При използването на имобилизирани клетки е установено, че в рамките на четиридесет цикъла се съхранява активното разграждане на фенол (20 g/l) и п-хексадекан (20 g/l) - общо количество 40 g/l.

Оригинални резултати са получени при проучване на деградационния потенциал на новоизолиран щам BN 66, таксономично определен като *Bacillus cereus*. Установена е способността на щама да разгражда алифатни съединения, съставки на суровия нефт, като единствен източник на въглерод. Установено е паралелно понижаване на повърхностното напрежение на хранителната среда, което предполага синтеза на повърхностноактивни вещества. Това се потвърждава и от стойността на индекса на емулсификация (EI24). Хроматографският анализ на алифатната фракция на суровия нефт (3 g/l) показва, че за 2 дни, п-алканите са почти напълно разградени (93%) от свободните клетки. Резултатите с имобилизирани клетки на щам *B. cereus* BN 66 показват, че при него имобилизацията е значително по-ефективна за дълъг период от време - 47 дни при висока скорост и стабилност. По-добри показатели са получени при използването на синтезираният от полимер с висока моларна маса - криогел PAAm.

Характеризирането на активността на щама по отношение и на някои силно токсични ароматни съединения (п-хексадекан, бензен, бифенил, толуен, нафтаден, антрацен и фенантрен) също е осъществено.

В глава Дискусия са обобщени и обсъдени получените експериментални резултати, като е направено и сравнение с получените от други изследователи сходни резултати. В тази глава са обосновани и формулирани основните научни и научно-приложни постижения в резултат на проведената експериментална дейност, което логично води до ясно формулиране на 9 изводи и 4 приноси, които съответстват на резултатите получени в хода на представената научна разработка.

- Опитите са извършвани в условия на полунепрекъсната биодеградация, позволяваща продължителни наблюдения на катаболитния потенциал на клетките. Приспособителният потенциал спрямо ароматни съединения се изразява в многократно увеличен брой цикли и способността на изследваните щамове да провеждат много активна биодеградация и по време на стационарната фаза. Постигната е висока адаптивност на клетките на изследваните щамове, в условия на полунепрекъсната биодеградация. Многократно повишения биодеградиционен потенциал на изследваните щамове *Rhodococcus wratislawiensis* BN38 и *Nocardia farcinica* BN26, се изразява ясно в значително повишения брой цикли, водещо до пълно изчерпване и минерализация на внасяния ксенобиотик.
- Установено е едновременно разграждане на ароматни и алифатни ксенобиотици. Постигнато е интензифициране на процесът на разграждане на фенол и хексадекан, чрез имобилизиране на микробните клетки на щам *Rhodococcus wratislawiensis* BN38 в криогелни носители на основата на метилцелулоза и щам *Micrococcus luteus* BN56 върху полиетилен оксидни криогелни носители.
- Високият катаболитен потенциал на имобилизирани клетки на *Rhodococcus wratislawiensis* BN38 спрямо хидрофилни и хидрофобни ксенобиотици е изключително устойчив във времето, което се дължи в голяма степен на избора на криогел, като носител, който позволява запазването на жизнеността и метаболитните способности на клетките. Това би могло да намери приложение в реалните процеси на биодеградация на промишлени отпадни води.
- Изолиран е нов бактериален щам BN66, идентифициран като *Bacillus cereus*. Доказана е способността му да синтезира повърхностноактивни вещества и да разгражда 93% от алифатната фракция на суров нефт за 48 часа. Подбрана е имобилизираща матрица, получена от полиакриламид с висока моларна маса, способна продължително да задържа клетките в носителя, стабилна и след 47 дни, а скоростта на разграждане от имобилизираните клетки се поддържа на

високо ниво до 22-ия цикъл на работа при полунепрекъснат режим на работа в сравнение със само три цикъла, осъществявани от свободни клетки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Считам, че в представеният дисертационен труд на тема „Биодеградация на ароматни и алифатни ксенобиотици от свободни и имобилизирани бактериални клетки“ напълно е отразено изпълнението на поставените задачи, представените резултати са значителни по обем и са интерпретирани подробно и убедително. Представени са оригинални и значими резултати и постижения. Разработката има завършен вид и съответства на всички научни изисквания.

Извършен е значителен обем експериментална работа и са постигнати оригинални научни и научно-приложни резултати по отношение на биодеградацията на въглеводородни ксенобиотици.

Учебната програма е напълно покрита от Докторанта (263 кредита от изискуеми 200), а публикационната активност (един доклад и четири публикации – три от които в Q3, IF от 2,421 и 25 открити цитата) определено надвишава изискванията на ЗЗРАС и Правилника за придобиване на академични степени и заемане на академични длъжности в Институт по микробиология на БАН за придобиване на научната степен „Доктор“.

По тези причини, убедено давам положителната си оценка и предлагам на уважаемите членове на Научното жури да гласуват положително за присъждане на Образователната и научна степен „Доктор“ на ас. Лиляна Василева Начева.

17.04.2022 г.

Подпис:

(доц. Златка Алексиева)