

№ 250 / 15.04.2022 г.  
ДО: Председателя на научното жури,  
София

назначено със Заповед № I-26/01.03.2022 г. на Директора на Институт по микробиология  
„Стефан Ангелов” - БАН

На Ваша Заповед № I-26/01.03.2022 г.

Приложено представям **РЕЦЕНЗИЯ**

Относно дисертационен труд за присъждане на ОНС „Доктор”  
в област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика,  
профессионално направление: 4.3 Биологически науки,  
научна специалност 01.06.12 „Микробиология“

**Автор:** асистент Лиляна Василева Начева , докторант в Лаборатория „Биоремедиация и биогорива“, Департамент „Биотехнология“, Институт по микробиология „Стефан Ангелов” - БАН

**Член на научното жури :**

проф. д-р Димитър Стефанов Кадийски, доктор на медицинските науки,

**Институция:** Институт по експериментална морфология, патология и антропология с музей (ИЕМПАМ) при БАН

**Адрес и контакти:**

**Пощенски адрес:** 1113 София, ул. „Акад. Георги Бончев“ бл. 25,  
ИЕМПАМ , БАН

**Електронен адрес:** dkadiysky@yahoo.com

**Телефони:** 02/979 2340; GSM 0887-68-65-16

Подпись

На основание  
чл. 2 от ЗЗЛД

София, 19.04.2022 г

Рецензиата е съставена в съответствие с изискванията на ЗРАСРБ и Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в Институт по микробиология „Стефан Ангелов” - БАН

## РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д-р Димитър Стефанов Кадийски, доктор на медицинските науки  
Институт по експериментална морфология, патология и антропология с музей  
(ИЕМПАМ) – БАН

Относно дисертационен труд за присъждане на ОНС „Доктор“  
в област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика,  
профессионално направление: 4.3 Биологически науки,  
научна специалност 01.06.12 „Микробиология“

**Автор:** асистент Лиляна Василева Начева, докторант в Лаборатория „Биоремедиация и биогорива“, Департамент „Биотехнология“, Институт по микробиология „Стеван Ангелов“ - БАН

**Тема:** „*Биодеградация на ароматни и алифатни ксенобиотици от свободни и имобилизиирани бактериални клетки*“

**Научен ръководител:** доц. д-р Людмила Кабаиванова

### 1. Общо представяне на процедурата и докторантката.

Със заповед I-26 / 01.03.2022 г. на Директора на Института по микробиология - БАН съм определен за член на научно жури във връзка с процедурата за защита на дисертационен труд на тема „*Биодеградация на ароматни и алифатни ксенобиотици от свободни и имобилизиирани бактериални клетки*“ за придобиване на образователната и научна степен (ОНС) „Доктор“ в професионално направление 4.3 Биологически науки, от област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, научна област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, научна специалност 01.06.12 „Микробиология“. Автор на дисертационния труд е асистент специалност 01.06.12 „Микробиология“ – докторант на самостоятелна форма на обучение в Института Лиляна Василева Начева – докторант на самостоятелна форма на обучение в Института по микробиология „Стеван Ангелов“ - БАН. За изготвяне на рецензията получих материалите, изискващи се от Правилника за развитие на академичния състав на Институт по микробиология и съобразени с правилата за приложение на ЗРАС в Република България и БАН.

Докторантката завърши през периода 1995 – 2001 г. Химикотехнологичния и металургичен университет – София. Нейното професионално направление е инженер-биотехнолог с магистърска специалност „Технология на биопроизводствата“. Основните компетентности произтичащи от образоването ѝ са в полето на микробиологията, биохимията, органичната и аналитична химия, физикохимия, химия на хранителните среди и анализ на биопродукти.

От 2000 г. до днес докторантката преминава всички етапи на последователно кариерно развитие през различни длъжности, вкл. лаборант, биотехнолог, научен сътрудник, асистент.

Почти цялата професионална биография на докторантката е свързана с научно-изследователската и образователна дейност провеждана в Института по микробиология „Стефан Ангелов“ - БАН. От януари 2015 г. досега тя заема длъжността асистент, а към днешна дата е отчислена от докторантура с право на защита след успешно преминала вътрешна апробация - дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на заседание на Националния научен семинар по „Приложна микробиология и микробни биотехнологии“ на 17.02.2022 г. в Институт по микробиология "Стефан „Ангелов“ - БАН.

## **2. Актуалност на тематиката.**

Дисертационната тема е свързана директно и индиректно с изключително важните днес проблеми за опазването на околната среда. Това личи още от поставената цел за разработването на настоящия дисертационен труд - да се проучи капацитета за биодеградация на ароматни и алифатни ксенобиотици от определени микробни видове в свободна и имобилизирана форма. Особено ценни в научно, екологично, а и в икономическо отношение са предложените биотехнологични подходи за детоксикация на води и почви. Тематиката на дисертационния труд обхваща методологии за пречистване на отпадните води чрез използване на биологични методи, основаващи се на способността на микроорганизмите да разграждат различни органични вещества в т.ч. и вещества с токсично действие.

## **3. Познаване на проблема.**

Уводът и литературният обзор с приведените в тях основни сведения за ролята на биотехнологиите в решаването на проблеми свързани със замърсяването на околната среда демонстрират добро познаване на състоянието на проблема, разработван от докторантката в дисертацията. Третират се въпроси за спецификата на ксенобиотичните вещества, процесите на биодеградация и биотрансформация, ролята на микроорганизми разграждащи алифатни въглеводороди, продукцията и приложението биоърфактани, както и промотиране на методи за имобилизация на микробни клетки.

## **4. Характеристика и оценка на дисертационния труд и приносите.**

Дисертационният труд е структуриран според общоприетите изисквания - увод, литературен обзор, цел и задачи, материал и методи, резултати, дискусия, изводи, приноси и литература. Той обхваща 105 страници, съдържа 7 схеми, 46 фигури и 5 таблици. Библиографската справка включва 181 литературни источника. В цялостната литературна интерпретация на проблема авторката разглежда ролята на ксенобиотиците при прогресивното замърсяване на околната среда и значителния възможен капацитет за биодеградация и детоксикация чрез микробиална активност. Дисертантката прави

преглед на съществуващи специфични биотехнологични решения свързани с проблема за замърсяването на околната среда. Това замърсяване придобива негативно значение в планетарен мащаб в резултат на демографския взрив, урбанизацията, научно-техническият прогрес и индустриализацията, които заедно и недвусмислено допринасят за прогресивното контаминиране на биосферата.

Представен е изчерпателен обзор на процесите на биодеградация и на факторите влияещи на биодеградационните процеси осъществявани от микроби. Съществуването на този тип микробиална биодеградация се разглежда като уникален подход, прилаган успешно в борбата изобщо с химическото замърсяване. Представените литературни данни потвърждават важния факт, че микроорганизмите представляват основния фактор за промяна в структурата на ксенобиотиците които откриваме в почвите и водите. Посочено е, че за биодеграционния капацитет на микроорганизмите има значение техният изключително голям потенциал за адаптация и микробиални трансформации. Авторката предоставя данни за разновидностите на известните до този момент микроорганизми - биодеграданти на ксенобиотици. Направеният анализ посочва, че ксенобиотични ароматни съединения се разграждат от голяма група микроорганизми, преди всичко Грам (-) отрицателни бактерии от род *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Acinetobacter*, *Ralstonia* и *Burkholderia*; Грам (+) положителни от род *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Bacillus*, *Geobacillus*; дрожди от род *Candida* и *Trichosporon*, плесени от род *Fusarium* и *Aspergillus*. Акцентуирано е, че най-съществена роля в биодеградацията на ксенобиотици в почвата и водите играят бактериите от следните родове *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcoligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Gordonia* и гъби от родовете *Pleurotus*, *Trametes*, *Coriolopsis*, *Fusarium*. В резултат на натрупването на все по-голямо количество микробиологична информация от този тип авторката успява да анализира в обзора си и данни за паралелните биотехнологични ефекти на акселерация, до каквито довежда въвеждането на биосърфактанти в системата. Разгледан е въпросът за приложение на клетъчната имобилизация и методите за имобилизация на микробни клетки, чрез използване на мембрани технологии (имобилизация в мембрани реактори).

Извършеният многопластов микробиологичен и биомедицински анализ на проблема е свързан пряко с опазването на околната среда. Това е позволило на дисертантката и на нейният научен ръководител да определят точно целта на изследването - проучване на способността на микробни видове в свободна и имобилизирана форма да биодеградират ароматни и алифатни ксенобиотици.

Материалът на изследването е достатъчен по обем, правилно подхран и структуриран, добре документиран и прецизно регистриран, което гарантира достоверност на резултатите.

Оценката на експерименталния **изследователски подход** показва, че докторантката е използвала за постигане на поставената цел надеждни и достатъчни като обем методи с които получава адекватен отговор на задачите. От шест на брой задачи, пряко свързани с целта произтича структурирана методология на решаването им: условия за

култивиране на микроорганизми, методи за имобилизация, синтез на криогелове от смес на хидроксипропилцелулоза (ХПЦ) и N-изопропилакриламид (НИПАМ), синтез на криогел, синтезиран от прекурсори на полиакриламид или акриламид с висока моларна маса, синтез на криогелни полиетиленоксид (PEO) и полиакриламидни (PAAm) матрици, изследвания със сканиращ електронен микроскоп (SEM), колориметрични методи, количествено определяне на биоърфактант, оценка на клетъчната хидрофобност, биодеградация на n-хексадекан, идентификация на щамове и др. Статистическите методи са подходящо подбрани с информативност, необходима за изследването. Изследванията, свързани с дисертационния труд са проведени в Лаборатория „Биоремедиация и биогорива“ в Институт по микробиология "Стефан „Ангелов“- БАН.

**Разделите резултати и дискусия** заемат общо 41 страници от изложението. Получените експериментални данни са нагледно показани и анализирани в представената документация. Демонстрира се, че избраните щамове *Rhodococcus wratislawiensis BN38*, *Nocardia farcinica BN26* и *Micrococcus luteus BN56* проявяват изразен биодеградационен потенциал към ароматния ксенобиотик фенол. Този потенциал на изследваните щамове се повишава многократно чрез адаптация, изразяваща се в по-големия брой цикли, по време на които внесеният ксенобиотик се разгражда изцяло. Получените данни от авторката на дисертацията показват, че адаптираните клетки на *Rhodococcus wratislawiensis BN38* притежават най-добрата способност за разграждане на фенол във всички изследвани концентрации, като катаболитният потенциал не намалява, а се запазва и по време на стационарната фаза на растеж на адаптирания щам. Направени са изводи, че щам *Rhodococcus wratislawiensis BN38* притежава висок биодеградационен потенциал спрямо хидрофилни (фенол) и хидрофобни (n-хексадекан) ксенобиотици поотделно и едновременно.

Наблюдавана е ясно изразена устойчивост и дълготрайност на изследваните процеси. При клетъчна имобилизация в криогелове от смес на хидроксипропилцелулоза и N-изопропилакриламид 1:1 в рамките на четиридесет цикъла се съхранява активното разграждане на фенол (20 g/l) и n-хексадекан (20 g/l) - общо количество 40 g/l. След *in situ* имобилизация в матрици от полиетилен оксид на клетки на *Micrococcus luteus*, са постигнати 40 цикъла на повтарящо се успешно едновременно биоразграждане на алифатния хексадекан и ароматния ксенобиотик фенол (20 g/l + 20 g/l), като биодеградацията не е възпрепятствана от никой от двата ксенобиотика.

Изолиран е нов бактериален щам BN66, който е идентифициран като *Bacillus cereus* и е доказана способността му да разгражда съставките на сировия нефт, което е оригинален принос на проучването. Имобилизирането на щам *Bacillus cereus BN66* в синтезиран от полимер с висока молекулна маса (PAAm) криогел води до стабилност и интензификация на биодеградационните процеси след имобилизация, потвърдено от високата степен на разграждане – до 100% от алифатната фракция след 20 цикъла без инхибиране.

В пет ясно оформени научно-приложни **приноса** авторката на дисертационния труд резюмира данните и резултатите от експерименталната си работа. Те са свързани със скрининг на процесите на биоразграждане на въглеводородни ксенобиотици. Оригинален принос на дисертантката е доказаната възможност за приложение на адаптираните и имобилизирани клетки на щам *Rhodococcus wratislawiensis BN38* и

*Micrococcus luteus BN56* в реални процеси на биологичното пречистване на отпадни води или замърсени почви. За първи път е осъществена имобилизация на клетки на новоизолирания щам *Bacillus cereus BN66* в криогелен носител на основата на полиакрил амид като начин за увеличаване интензивността на процеса, който е приложим в биоремедиацията на замърсени с петрол места. Доказано е, че използването на техниката на имобилизация е успешен подход, което се демонстрира чрез високата ефективност на имобилизираните клетки на *Rhodococcus wratislawiensis BN38*, *Micrococcus luteus BN56* и *Bacillus cereus BN66*. Имобилизацията на жизнеспособни микробни клетки, постиганата чрез закрепване, вмъкване в обема или захващане, локализира клетките в определен регион и позволява многократното използване на тяхната каталитична активност. Високата ефективност на имобилизираните клетки и високият афинитет между матрицата и субстратите водят до ефективно биоразграждане. Имобилизирането на живи клетки в супермакропорести матрици предлага огромни предимства за тяхната повторна употреба и стабилност при непрекъсната работа.

На последно място трябва да посоча, че за **визуализацията** на криогелните матрици и имобилизираните в тях клетки докторантката използва модерни морфологични методи, какъвто метод е изследването със сканиращ електронен микроскоп (SEM) на клетките и матрицата. Наблюденията със сканираща електронна микроскопия потвърждават морфологично, че клетките запазват формата си и равномерното си разпределение под повърхността на матрицата в образуваните канали и изглеждат частично вградени в порите на матрицата след много цикли на употреба.

##### **5. Преценка на публикациите и личния принос на докторантката.**

Основните резултати от изследването са публикувани освен в български (*Comptes Rendus de L'academie Bulgare des Sciences*) и в чуждестранни научни издания (*Polish Journal of Microbiology, Biotechnology & Biotechnological Equipment*). Публикациите са в съавторство, но личните ми впечатления от работата на екипа под ръководството на доц. Людмила Кабаиванова mi дават основание да не се съмнявам, че **асистент Лиляна Начева има своя основен принос** в голяма част от резултатите.

Направената справка за **изпълнение на минималните изисквания** за точки по групи показатели за придобиване на ОНС „доктор“ според ЗРАСРБ и неговия Правилник показва напълно покриване (50 точки) по група А и високи показатели в групи Г, Д, Е, независимо че те не са задължителни за придобиването на тази научна степен.

Общийят брой **цитирания** по публикациите по темата на дисертацията са 28.

Общийят брой набрани **кредити** по образователната докторска програма са 263, при 200 задължителни.

Четири са публикациите свързани с дисертационния труд, като **импакт факторът (IF)** от тази публикационна активност на докторантката е немалък: 2,421.

##### **6. Авторефератът**

е структуриран правилно, отразява съдържанието, основните резултати и приносите на дисертационния труд.

## **7. Препоръките**

ми са при по-нататъшната научноизследователска дейност на докторантката да се работи както за бъдещо разширяване на видовете изследвани ксенобиотични фактори, така и за екстензивно изучаване на неисследвани досега бактериални щамове по отношение на капацитета им за биодеградация.

## **8. ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Дисертационният труд на асистент Лилияна Василева Начева разглежда микробиологичен проблем, решаването на който има освен научен така и конкретен практически ефект в областта на екологията и опазването на природните ресурси. Получени са резултати, обогатяващи технологиите за възстановяване на чистотата на биосферните системи. Авторката за създава подробна сравнителна микробиологична характеристика на биодеградационния капацитет на определени щамове, като освен идентификация, тя предлага оптимални работещи биотехнологии.

Оформлението на дисертационния труд и на автореферата е много добро. Извършена е голяма по обем и трудна за изпълнение работа. Това показва, че докторантката притежава теоретични знания и професионални умения по научната специалност, както и опит при провеждане на самостоятелни научни изследвания. Материалите и документите по процедурата отговарят на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилника за прилагане на този закон и Регламентите за придобиване на ОНС „Доктор“ в Институт по микробиология „Стеван Ангелов“ - БАН.

Въз основа на изложеното дотук давам положителна оценка за проведеното научно изследване отразено в дисертационния труд, като **предлагам на почитаемото научно жури да присъди на асистент Лилияна Василева Начева образователната и научна степен „Доктор“ в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление: 4.3 Биологически науки, научна специалност 01.06.12 „Микробиология“.**

Проф. д-р Димитър Кадийски, дмн

**На основание  
чл. 2 от ЗЗЛД**

София, 19.04.2022 г.