

## РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д-р Велизар Костадинов Гочев,  
ръководител на катедра „Биохимия и микробиология“,  
Биологически факултет, ПУ „Паисий Хилендарски“

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „доктор“  
по: област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика  
професионално направление 4.3 Биологически науки  
докторска програма Микробиология

**Автор:** *ас. Николина Атанасова Атанасова*

**Тема:** *Разграждане на пластмаси от термофилни и халофилни бактерии, изолирани от български екстремни ниши*

**Научен ръководител:** *проф. дн Маргарита Стоянова Камбурова*

### 1. Общо описание на представените материали

Със заповед № I-44/31.03.2023 г. на Директора на Институт по микробиология „Стефан Ангелов“ при Българска академия на науките (ИмикБ – БАН) съм определен за член на научното жури за осигуряване на процедура за защита на дисертационен труд на тема ***Разграждане на пластмаси от термофилни и халофилни бактерии, изолирани от български екстремни ниши*** за придобиване на образователната и научна степен „доктор“ в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3 Биологически науки, докторска програма Микробиология. Автор на дисертационния труд е *ас. Николина Атанасова Атанасова* – докторантка на самостоятелна подготовка към лаборатория „Екстремофилни микроорганизми“, департамент „Обща микробиология“ с научен ръководител *проф. дн Маргарита Стоянова Камбурова* от ИмикБ – БАН.

Представеният от *ас. Николина Атанасова* комплект материали е в съответствие с изискванията на Правилника за условията и реда на придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в ИмикБ – БАН (ПУРНСАД) и Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), включва следните документи: заявление до Директора на ИмикБ – БАН за разкриване на процедурата за защита на дисертационен труд; автобиография в европейски формат; диплома за висше образование ОКС „магистър“; заповед за зачисляване; протоколи и сертификати, удостоверяващи успешно положени изпити и курсове; справка за получени кредити от обучението; справка за изпълнение на минималните нацио-

нални критерии за придобиване на ОНС „доктор“; протокол от заседанието на националния семинар по „Обща микробиология“, свързан с докладване на готовността за откриване на процедурата и с предварителна защита на дисертационния труд и предварителна рецензия на дисертационния труд; дисертационен труд; автореферат – на български и английски език; списък на научните публикации по темата на дисертацията; списък на забелязани цитирания; декларация за оригиналност и достоверност на приложените документи.

## **2. Кратки биографични данни за докторанта**

През 2005 г., докторант Николина Атанасова е завършила Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски“, придобивайки ОКС „магистър“ по специалност “Биотехнологии“ с квалификация биотехнолог – магистър по индустриални биотехнологии. В периода 2005 – 2008 г. работи като специалист – биотехнолог в ИМикБ – БАН, а от 2008 г. заема академичната длъжност „асистент“ в същия институт.

## **3. Актуалност на тематиката и целесъобразност на поставените цели и задачи**

Екологичният проблем, изразяващ се в натрупване на големи количества ксенобиотици от различен тип в околната среда, е един от основните проблеми на съвременното общество, рефлектиращ върху качеството на живот в дългосрочен план. Пластмасите представляват голяма група отпадъци, които се преработват основно чрез депониране или изгаряне и почти не подлежат на разграждане в околната среда. Разработването на ефективни и екологични методи за биодegradация на пластмасови отпадъци е важен и особено актуален изследователски проблем както от практическа, така и от фундаментална гледна точка, което поставя настоящия дисертационен труд във фокуса на най-актуалните изследователски тематики на полето на микробните екологични биотехнологии.

## **4. Познаване на проблема**

Литературният обзор се основава на 187 актуални литературни източници и включва класификация на различни видове пластмаси, разглежда техния химичен състав, строеж и потенциални приложения. Описани са различните механизми за биодegradация на пластмаси и методите за оценка на биодegradационен потенциал на микроорганизмите. Поставен е акцент върху възможностите на екстремофилните микроорганизми (термофилни, психрофилни, алкалофилни и халофилни) да разграждат пластмасови отпадъци. Обзорът е изчерпателен и завършва с формулиране на нерешените изследователски проблеми в направлението, което позволява ясно да се мотивира необходимостта от разработване на настоящия дисертационен труд. Начинът на оформяне на обзора и неговата изчерпателност показват, че докторантката е много добре запозната с разработвания изследователски проблем.

## 5. Методика на изследването

За постигане на основата цел и проверка на изследователската хипотеза е разработена и изпълнена мащабна експериментална схема, която далеч надхвърля и целта на работата, и обхвата на дисертационен труд за придобиване на ОНС „доктор“. За реализация на изследователските задачи са използвани класически и съвременни микробиологични, биохимични, инструментални и микроскопски методи, описани лаконично, но по начин, който гарантира точност и позволява възпроизводство на получените резултати.

## 6. Характеристика и оценка на дисертационния труд

Дисертационният труд е структуриран по възприетия начин, включващ разделите Увод (2 стр.), Литературен обзор (58 стр.), Цел и задачи (2 стр.), Материали и методи (13 стр.), Резултати и обсъждане (65 стр.), Изводи (3 стр.), Приноси (2 стр.) и Литература (26 стр.). Уводът по категоричен начин поставя сериозността на изследователския проблем, като ясно дефинира негативните ефекти от замърсяването с пластмаси върху околната среда и обществото. Както вече отбелязах, Литературният обзор е изчерпателен, но обемът му би могъл да бъде редуциран, а стилът на изложението по-лаконичен и аналитичен. В този раздел се наблюдава прекалена фрагментация на информацията с обособяване на голям брой точки - 11, някои от които е можело да бъдат обединени. Целта и изследователската хипотеза са ясно и точно формулирани. За реализацията им са формулирани 12 изследователски задачи, които е трябвало да бъдат обобщени, защото в настоящия вид създават усещане за работна програма. На база анализ на вида на пластмасовите отпадъци в избраните местообитания – минерални извори Рупи, Левуново, Марикостиново, Симитли и Долно Осеново, докторантката включва в изследването четири вида пластмаси – поливинилов алкохол (ПВА), поликапролактон (ПКЛ), полипропилен (ПП) и полистирен (ПС). Експерименталната работа започва с подбор на термофилни микроорганизми от колекцията на лаборатория „Екстремофилни микроорганизми“ с потенциал да разграждат четирите вида пластмаси. Тествани са 80 щамове от 8 различни рода. Установена е висока естеразна активност на представители от видовете *Geobacillus thermodenitrificans* и *Geobacillus stearothermophilus* по отношение на субстрати ПС и ПП. Определен е биофилм-формирация капацитет на шамовете, като е установено, че те не притежават потенциал да формират биофилм, което обуславя и ниската скорост на разграждане на изследваните видове пластмаси. По тази причина докторантката се насочва към изолирането на нови шамове от екстремни местообитания – 5 различни геотремални извора с температура на водата от 46 °C до 72°C. След набогатяване, смесените микробни съобщества са тествани за естеразна активност и способност да разграждат ПВА, ПКЛ, ПП и ПС. Най-добри резултати по отношение растеж на микробната култура и биодеградационен потенциал са установени за

смесената култура от извор Марикостиново. Чрез метагеномен анализ е определено филогенетичното разнообразие в микробното съобщество в присъствие на ПКЛ и ПС. Доказани са различия в степента на селективния натиска на ПКЛ и ПС върху биоразнообразието в състава на съобществата и доминиране на представители от родовете *Meiothermus* и *Brevibacillus*. От смесената култура са изолирани 18 щамове във вид на чисти култури, които са видово идентифицирани чрез секвениране на 16S рРНК. От всички изолати, на база висока естеразна активност 290 E/ml е селектиран щам *Brevibacillus thermoruber*, който е депозиран в НБПМКК и WDCM. Установено е, че при съвместно култивиране в ко-култура на *Brevibacillus thermoruber* и *Aneuribacillus thermoaerophilus* се постига по-висока естеразна активност. За първи път в науката се съобщава за термофилен щам *Brevibacillus thermoruber*, който е в състояние да разгражда ПКЛ. Оптимизирани са условията за култивиране на чистата монокултура, ко-културата от двата щамове и смесеното микробно съобщество, по отношение на температурен оптимум, рН-оптимум и концентрация на субстрата. Със смесеното съобщество, изолирано от извор Марикостиново е постигнато пълно разграждане на ПКЛ за 4 седмици. Доказана е екстрацелуларна продукция на липаза и е изследвано влиянието на Мм на ПКЛ върху скоростта на биодеградация, като не са установени съществени различия при субстрати с Мм 8000 и 14000 Da. Проведен е хроматографски анализ на разградните продукти, получени под действието на щам *Brevibacillus thermoruber*, комбинация от *Brevibacillus thermoruber* и *Aneuribacillus thermoaerophilus* и смесеното съобщество. Изказани са мотивирани предположения, че щам *Brevibacillus thermoruber*, продуцира ензим с екзодействие, а щам *Aneuribacillus thermoaerophilus* – ензим с ендодействие. Чрез СЕМ е анализирана повърхността на пластмасите, третирана с чиста монокултура, смесена ко-култура и микробно съобщество като е отчетено наличието и отсъствието на биофилм и вида на повърхностните промени върху субстрата. Експерименталната работа продължава с разработване на лабораторна схема за изолиране и пречистване на липазата, продуцирана от *Brevibacillus thermoruber* и определяне на температурен и рН-оптимум на ензима, диапазон на температурна стабилност, влияние на метални йони и ЕДТА, Vmax и субстратна специфичност. Чрез СЕМ е анализирана повърхността на пластмасите, третирана с пречистения ензим, като са регистрирани промените в структурата на пластмасовия субстрат. Работата продължава с аналогични експерименти, касаещи халофилни щамове. За биодеградация на ПВА, ПКЛ, ПС и ПП са тествани са 16 халофилни щамове от 7 различни рода от колекцията на лаборатория „Екстремофилни микроорганизми“, но са установени перспективни щамове. От луга, вода и кал от Поморийски и Бургаски солници са изолирани микробни съобщества с биодеградационен потенциал по отношение на изследваните видове пластмаси. Чрез метагеномен анализ е определена структурата

на съобществата в присъствие и отсъствие на ПКЛ. В присъствие на ПКЛ е установено е наличие на представители от 12 филогенетични групи, отнасящи се към 5 разреда с доминиране на *Halomonadaceae*. Във вид на чисти култури са изолирани 6 щамове, които са видово идентифицирани чрез секвениране на 16S рРНК, отнесени към два вида от род *Virginibacillus* и един вид от род *Oceanobacillus*.

Мащабността и последователността на експерименталната схема, получените резултати и тълкуването им са впечатляващи. На база на получените резултати са формулирани 12 извода и 8 приноси с висока степен на оригиналност, както от фундаментална, така и от практическа гледна точка.

### **7. Преценка на публикациите по дисертационния труд**

Във връзка с дисертационния труд са представени четири научни публикации, от които една в списание с квантил  $Q_1$ , две – с квантил  $Q_2$  и една – с квантил  $Q_4$ . Публикациите отразяват съществени резултати от дисертационния труд. За период по-кратък от две години, публикациите са получили 31 положителни цитирания, което е безспорен атестат за високото качество и оригиналност на получените резултати.

### **8. Лично участие на докторантката**

Считам, че личното участие на докторантката в реализацията на експерименталната работа, обсъждането на резултатите, оформянето на дисертационния труд и публикациите към него е релевантно на нивото на компетентността ѝ и го оценявам като водещо, като държа да подчертая, че във всеки от изброените елементи ясно личат високата ерудиция и стил на научния ръководител проф. дн Маргарита Камбурова.

### **9. Автореферат**

Авторефератът е изготвен според изискванията на съответните правилници и отразява основните резултати, постигнати в дисертацията.

### **10. Критични забележки и препоръки**

Бележките и препоръките към отделните части на дисертационния труд са посочени в рецензията в раздел 6. Характеристика и оценка на дисертационния труд.

### **11. Лични впечатления**

Не познавам докторантката и нямам лични впечатления от нея.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Дисертационният труд съдържа научни, научно-приложни и приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката и отговарят на всички изисквания на ЗРАСРБ, Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и ПУРНСАД на ИМикБ – БАН. Дисертационният труд показва, че докторантката Николина Атанасова Атанасова притежава задълбочени теоретични знания и професионални умения по научна специалност „Микробиология“ като демонстрира качества и умения за самостоятелно провеждане на научно изследване. Поради гореизложеното, убедено давам своята положителна оценка за проведеното изследване, представено от рецензираните по-горе дисертационен труд, автореферат, постигнати резултати и приноси, и предлагам на почитаемото научно жури да присъди образователната и научна степен „доктор“ на Николина Атанасова Атанасова в област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3 Биологически науки, докторска програма Микробиология.

21.05.2023 г.

Рецензент: .....

*(проф. д-р Велизар Гочев)*