

Рецензия

на дисертационен труд на тема:

„Кинетични и диелектрични изследвания върху биодegradация на фенол”,
разработена от Филадия Павлова Тилева-Дилчовска,
за придобиване на образователната и научна степен „Доктор”
по научна специалност „Биоорганична химия, химия на природните и
физиологично активни вещества”

Научни ръководители: Доц. д-р инж. Любов Йотова
Катедра „Биотехнология”
ХТМУ

Проф. д-р Джерард Маркс
Университет Хериот – Ват
Единбург, Англия

Рецензент: Доц. д-р инж. Силиян Чаушев
Катедра „Инженерна химия”
ХТМУ

1. Кратки биографични данни и характеристика на научните интереси на кандидата

Филадия Тилева-Дилчовска е родена на 13.03.1975 г. През 1998 г. завършва ХТМУ, специалност „Химични технологии”, специализация „Биотехнологии” с образователно-квалификационна степен „Магистър”.

През м. Март, 2000 г. е зачислена като задочен докторант в катедра „Биотехнология”. Отчислена е през м. Септември 2004 г. е с право на защита.

Научните интереси на докторантката са в областта на биотехнологиите, биоаналитичната химия, анализа на токсични вещества и получаването на нови биокатализатори за приложни процеси.

2. Преглед на дисертационния труд и анализ на резултатите

Дисертационният труд на тема *„Кинетични и диелектрични изследвания върху биодegradация на фенол”* съдържа 118 страници и в неговия текст са цитирани 150 литературни източника, главно от последните две десетилетия, като 12 % са от последните 5 години, а 50 % от последните 10 години.

Актуалността на изследваната тема произтича от факта, че тя има пряко отношение към проблемите на запазване на качеството на параметрите на околната среда. Както правилно е отбелязано в работата, фенолът и неговите производни се отнасят към групата на т. нар. „ксенобиотици”, които благодарение на своите специфични свойства

имат неблагоприятно въздействие върху различните биологични организми и най-вече върху човека.

В литературния обзор на дисертационния труд, представен на 31 страници, е направена подробна и изчерпателна характеристика на фенола и фенолните съединения като замърсители в отпадъчните води от редица индустриални дейности. Изяснен е механизмът на фенолната биодеградация в аеробни и анаеробни условия. Това е сложен процес, който се влияе от редица параметри като рН на средата, температура, концентрация на кислорода, присъствие на метални йони и др.

Фенолът (CAS № 108-95-2) е токсичен при много ниски концентрации и от няколко възможни технологични процеси за неговото отстраняване от отпадъчните води биотехнологичният метод по редица съображения, най-вече икономически, е най-приемливият. След биологичното третиране на отпадъчните води фенолът се разгражда до безвредни крайни продукти. Показано е, че този процес може да се извърши при аеробни условия с широк кръг от микроорганизми и дрожди, които могат да бъдат както в свободно, така и в имобилизирано състояние. Съществено предимство на методите с имобилизирани клетки е фактът, че техните ензимни системи съхраняват своята активност независимо от това дали клетката е жива или не.

В тази част на дисертационния труд е направена критична оценка на моделите за описание на клетъчния растеж. По своята природа тези модели се отнасят към два вида - т. нар. „структурирани” и „неструктурирани”. Първите описват механизмите на вътрешноклетъчния растеж, които по-принцип са много сложни, докато неструктурираните модели дават възможност за макроскопична оценка на протичащите в системата биохимични трансформации. В основата на неструктурираните модели стоят параметри, които могат лесно да се идентифицират и контролират в хода на биотехнологичния процес. Към тези модели се отнасят уравненията на *Monod* и *Haldane*, както и някои други субстрат-инхибиращи кинетични модели, представени в Таблица 3, стр. 23.

Значително внимание в литературния обзор е обърнато на диелектричните методи за изследване устойчивостта на клетките към токсични замърсители. Подробно са анализирани електрическите свойства на клетките. Показана е възможността за използване на апарата *Biomass monitor* за измерване на капацитета на клетъчна суспензия както в лабораторни, така и в индустриални условия в честотния обхват (0.1 ÷ 10) MHz.

В последната част на обзора е дискутиран проблемът за пречистване на отпадъчни води, в които освен токсични органични замърсители присъстват и йони на тежки метали като Fe, Mo, Mn, Zn, Cr, As, Ag, Hg, Pb и др. Микроорганизмите притежават уникалната възможност да извличат йоните на тежките метали от замърсената среда по различни механизми – чрез чисто физична адсорбция (биосорбция) или чрез транспорт

на металните йони във вътрешността на клетката и тяхното включване в метаболитните процеси (биоаккумуляция).

Като резултат от направения критичен литературен обзор са дефинирани целта и задачите на дисертационната работа, които са представени на стр. 35, а именно:

- **Да се изследва биодegradацията на фенол с помощта на свободни и имобилизирани клетки върху синтетичен носител с оглед оценка на възможностите за приложение на изследвания процес при пречистването на отпадъчни води.**

За изпълнението на тази цел са формулирани следните конкретни задачи:

1. Да се свържат ковалентно клетки от *Trichosporon cutaneum* R57 към съполимер на акриламид и акрилонитрил.
2. Получените имобилизирани клетки да бъдат охарактеризирани по отношение на свойствата им за биодegradация на фенол при различни условия и сравнени със свободните клетки.
3. Да се определят кинетичните параметри на изследваните процеси и да се намери адекватен математически модел, описващ процеса на биоразграждане със свободни и имобилизирани клетки.
4. Да се изследва устойчивостта на клетки *Trichosporon cutaneum* R57 спрямо различни токсични органични съединения чрез диелектрични измервания.
5. Да се изследва биодegradацията и биоаккумуляцията на други токсични замърсители от клетки *Trichosporon cutaneum* R57.

Експерименталната част на дисертационния труд е представена на 57 страници. В нея прецизно и ясно са характеризирани използваните материали и методи, процесът на култивиране на щама *Trichosporon cutaneum* R57, ковалентната имобилизация на клетки *T. cutaneum* R57 върху полимерен носител, аналитичните методи, използвани за охарактеризиране на щама *T. cutaneum* R57 и на състава на отпадъчните води.

Подробно е описан численият алгоритъм за определяне на стойностите на кинетичните параметри (μ , μ_{max} и K_S) и избора на подходящ кинетичен модел, приложим за процеса на субстратно инхибиране при свободни и имобилизирани клетки.

Демонстрирана е възможността за охарактеризиране на щама *T. cutaneum* R57 с помощта на електронно-сканиращ микроскоп *Nikon EXLIPSE E600*, както и за измерване на диелектричните свойства на клетъчната култура в „on-line” режим при биодegradация на фенол с различна начална концентрация със свободни и имобилизирани клетки.

Получените експериментални данни и резултати от математичното моделиране на кинетиката на процеса на биодеградация на фенола като самостоятелен субстрат и в смес с други вещества са обобщени в следните направления (както са представени на стр. 106 от дисертацията, глава „Изводи“):

■ **Експериментално са получени ковалентно свързани клетки *Trichosporon cutaneum* R57 към синтетичен полимерен носител.**

- При изследване на процеса на биодеградация на фенол с имобилизирани клетки *Trichosporon cutaneum* R57 е установено, че скоростта на намаляване на концентрацията на фенола в субстрата е най-висока при начална концентрация на фенола 0,35 g/l. С увеличаване на началната концентрация на фенола в субстрата намалява скоростта на неговото разграждане, което е признак за субстратно инхибиране.
- При начална концентрация на фенола в субстрата 1,0 g/l нейното понижаване до 0,001 g/l се достига за около 10 часа при свободните клетки, а при имобилизираните клетки - за 40 часа.
- Имобилизираните клетки *Trichosporon cutaneum* R57 към съполимер на акрилонитрила с акриламида след предварителна адаптация могат да разградят фенол с концентрация от 0,65 g/l за по-малко от 10 часа.
- Установено е закономерно изменение на кинетичните параметри на процеса биодеградация на фенола при увеличаване на началната концентрация на фенола в субстрата. Експериментално е определено, че възможната максимална начална концентрация на фенола в субстрата, която може да бъде успешно атакувана, е 1,0 g/l за свободните и имобилизирани клетки. При по-високи концентрации на фенола се наблюдава силно инхибиране на процеса.

■ **Изчислени са кинетичните параметри на процеса биодеградация на фенол с имобилизирани клетки**

- Анализът на експерименталните данни с помощта на кинетичния модел на *Monod* показва, че получените стойности на параметрите на привидната скорост на растеж варират в зависимост от субстратната концентрация ($\mu_{\text{maxapp}} = (0,43 \div 0,13) \text{ h}^{-1}$; $K_{\text{sapp}} = (0,037 \div 0,4) \text{ g/l}$). Намаляването на максималната скорост на клетъчен растеж с увеличаване на концентрацията на фенола в субстрата съвпада с увеличаване на стойността на константата на *Monod*. Това е доказателство, че с увеличаване на концентрацията на фенола в субстрата (над 1,0 g/l) започват да се появяват ефектите на инхибиране.

- Направена е оценка за адекватност на три модела, описващи процеса на субстратното инхибиране и е установено, че най-подходящ е моделът на *Haldane* (Модел 1)

$$\mu = \frac{\mu_{max}}{(1 + K_s / S + S / K_i)}$$

- Чрез BETX е установена концентрация на фенола в реалните отпадъчни води 0,603 g/l. При тази концентрация на фенола е направена оценка на пригодността на субстратните инхибиторни модели при фиксирани стойности на параметрите μ_{max} , K_s и K_i . Сравненията между изчислените по трите модела кинетични криви и експерименталните данни показват, че и при моделните, и при реалните отпадъчни води изчислените криви по модела на *Haldane* описват най-добре експерименталните данни.
- **Изследвано е токсичното действие на фенол, бензилов алкохол и *n*-октанол върху клетки *Trichosporon cutaneum* R57 чрез диелектрични измервания в радиочестотната област.**
 - Установено е, че клетките *T. cutaneum* R57 проявяват известен толеранс при директното прибавяне на органични съединения с ниска концентрация (0,5 g/l и 1,0 g/l), но при по-високите концентрации (2,0 g/l и 5,0 g/l), клетките култивирани на различни хранителни среди показват различно поведение.
 - Клетки *T. cutaneum* R57, култивирани на среда, съдържаща 1,0 g/l фенол, са по-резистентни към полярни ароматни токсични вещества, като фенол ($\log P_{ow}=1,48$) и бензилов алкохол ($\log P_{ow}=1,1$), но по-малко резистентни към неполярни органични вещества, като *n*-октанол ($\log P_{ow}=2,9$). Това означава, че предварително адаптирани клетки в среда, съдържаща фенол, са по-устойчиви към неблагоприятните условия, включващи висока субстратна концентрация, което вероятно се дължи на вече изградения механизъм за разграждане на фенол.
 - Щамът *T. cutaneum* R57 разгражда и може да използва глюкоза, фенол и бензилов алкохол като въглероден източник, но не може да разгражда *n*-октанол.
 - Щамът *T. cutaneum* R57 може да биоакумулира мед и други тежки метали, което е едно предимство, когато този щам се използва за пречистване на отпадъчни води, съдържащи освен ксенобиотици и тежки метали, което е често срещан случай в химическата индустрия.

3. Характеристика и оценка на приносите в дисертационния труд

Научните и научно-приложни приноси в дисертационния труд, така както са представени на стр.108 от дисертацията, са следните:

- 3.1. Извършено е ковалентно свързване на филаментозни дрожди *Trichosporon cutaneum* R57 към синтетичен гранулиран полимерен носител.
- 3.2. Имобилизирани клетки са охарактеризирани по отношение на свойствата им за биодеградация на фенол при различни условия.
- 3.3. Определени са кинетичните параметри, описващи клетъчния растеж на свободни и имобилизирани клетки в присъствие на различни токсични вещества, както и при различна субстратна концентрация.
- 3.4. Намерен е адекватен математичен модел описващ процеса на разграждане със свободни и имобилизирани клетки.
- 3.5. Изследвана е устойчивостта на клетки *Trichosporon cutaneum* R57 спрямо различни токсични органични съединения чрез диелектрични измервания.
- 3.6. Имобилизирани клетки са успешно използвани за биодеградация на фенол в отпадъчни води.

Общата ми оценка е, че така формулираните приноси на изследванията в дисертационния труд отразяват адекватно постигнатите резултати. Според мен е необходимо известно прецизиране на извод 3.4 (в дисертацията под номер 4 на стр. 108) „Намерен е адекватен математичен модел описващ ...”, в смисъл адекватен до каква степен? Ако се погледне внимателно фиг. 15 на стр. 58 в дисертацията, непредубеденият читател трудно би се съгласил, че Модел 2 (стр. 43, уравнението на *Yano и Koga*) описва адекватно експерименталните данни за биодеградацията на фенола в изследвания диапазон от концентрации. По същия начин от известна редакция има необходимост и извод 3.5 (в дисертацията извод номер 5 на стр. 108) „Изследвана е устойчивостта на клетки *Trichosporon cutaneum* R57 спрямо различни токсични органични съединения чрез диелектрични измервания”. Не става ясно какъв е приносът – изследването на устойчивостта на клетките или използваният метод на диелектричните измервания. Процесът на изследване е само средство, а не принос.

4. Мнение за публикациите на дисертанта по темата на дисертационния труд

По темата на дисертационния труд са направени следните публикации:

- 4.1. В международни и национални специализирани издания
Общо 3 бр.
От тях: 2 публикации в списания с импакт фактор.

4.2. Статии, отпечатани в пълен текст в сборници на научни конференции
Общо 2 бр.

4.3. Симпозиуми и международни конференции
Общо 2 бр.

4.4. Участие в проекти
Общо 2 бр. (международни проекти по NATO и ERASMUS в партньорство с University of Manchester).

Както се вижда от направения баланс на публикациите, техният брой и качество далеч надхвърлят минималните изисквания съгласно Правилника за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в ХТМУ.

Направените публикации отразяват коректно постигнатите резултати при разработване на дисертационния труд.

От представените за рецензия документи (дисертационен труд, автореферат) не става ясно дали по направените публикации не са забелязани цитати в специализираните научни издания.

5. Критични бележки и коментари.

Основните ми критични бележки са следствие от констатираните грешни изписвания на думи и неправилните и неразбираеми конструкции на изречения в текста.

Според мен дисертационната работа би станала по-прегледна, ако след съдържанието бяха приложени списъци на фигурите и таблиците с техните наименования.

6. Лични впечатления за дисертанта.

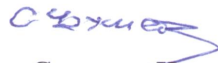
Личните ми впечатления от докторантката са от учебния процес и моето пребиваване на територията на катедра „Биотехнология” като лектор по дисциплината „Симулиране на битехнологични инсталации”. Според мен Филадия е сериозен и мотивиран млад изследовател с отлични перспективи за развитие

7. Заключение

Авторефератът напълно отразява резултатите и постиженията в дисертацията и са отстранени всички пропуски, установени в дисертацията. Това ми дава основание да препоръчам неговото отпечатване.

На основата на направения анализ на качеството на изследванията в дисертационната работа, използването на съвременни аналитични методи за анализ и идентификация, направените публикации в списания с импакт фактор, актуалността на темата на изследванията по отношение подобряването на параметрите на околната среда, изискванията на Правилника за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в ХТМУ препоръчвам на Уважаемото научно жури да присъди на докторантката Филадия Павлова Тилева-Дилчовска образователната и научна степен „Доктор” по научната специалност „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активни вещества”.

21.12.2011 г.

Рецензент: 
Доц. д-р инж. Стилиан Чаушев