

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертация на тема „Изследвания върху формирането, структурата и приложенията на биофилми”

на инж. Десислава Антонова Маринкова-Калоянова

за придобиване на образователната и научна степен „доктор” по научна специалност 01.05.10: „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активни вещества”

от доц.д-р Ирен Хернани Цибранска, кат. „Инженерна химия” при ХТМУ-София

Област на изследване на дисертационния труд са биофилмите, чиято актуалност се вижда ясно от големия научен интерес и брой научни публикации, както и във все по-широкия спектър на изследвания и използвани методи. Областта е изключително широка поради многобройните и разнопосочни проявления на биофилмите – както отрицателни, така и положителни – в широк спектър от въздействия, включващ и промишлените приложения на различни биопроцеси, както и технологии за очистка на води и газове.

Представеният дисертационен труд има за обект на изследване биофилми от три различни щамове микроорганизми: *Arthrobacter oxydans* 1388, *Pseudomonas species* 1625 и *Saccharomyces cerevisiae*, формирани върху различни синтетични полимерни носители: полиметилметакрилат (PMMA□), съполимер на акрилонитрил с акриламид (PAN+PAA), смес от съполимер на акрилонитрил с акриламид и целулозен ацетат бутират (PAA+PAN)+CAB, съполимер на акрилонитрил с акриламид и целулозен ацетат бутират и титанов бутоксид(PAA+PAN)+CAB+TBOT. Формираните биофилми са визуализирани чрез сканираща електронна микроскопия (SEM), оптична микроскопия, повърхнинна плазмонна микроскопия, микроскоп на пълно вътрешно отражение (ПВО). Тяхната структура е характеризирана чрез реологичните им характеристики въз основа на измервания с кварцово-кристална микровезна: вискоеластичните им свойства са определени в резонаторен режим на срязване в дълбочина (TSM). Приложенията на формираните биофилми са изследвани по отношение на процесите на: конверсия на NH_4Cl от биофилми на клетки от *Arthrobacter oxydans* 1388, разграждане на фенол и/или бензилов алкохол от биофилми на *Pseudomonas species* 1625, приложение на биофилми от клетки на *Saccharomyces cerevisiae* в процеса на алкохолна ферментация на лигноцелулозни хидролизати.

От обема и вида на извършените изследвания се вижда, че дисертационният труд защитава поставената тема, към която може да се направи забележката, че е твърде широка и обща. След прочита на работата, обаче, се вижда, че е предприето едно изследване на широка основа, което

наистина отговаря на тази по-широка по мащабите си тема като представя достатъчен обем изследвания във всяко от посочените в заглавието *три направления*: формиране на биофилма, характеризирание и визуализиране на неговата структура, изследване на свойствата му в приложение към конкретни процеси – предимства и недостатъци в сравнение с поведението на свободните клетки. Изследването включва голям обем разнородни по характер експерименти, които са не само времеемки, но и изискват запознаването на докторанта с различни и нови за него методи на изследване. Това несъмнено повишава и разширява неговата квалификация, което е и една от целите на всяка докторантура.

Дисертационният труд е представен в обем от 139 стр., от които 33 стр. са посветени на литературен обзор, 25 стр. представят постановката на експериментите и описанието на използваните материали, методи и апаратура, 64 стр. показват получените резултати и дискусия, следвани от цитирани 184 литературни източника. Резултатите от изследването са илюстрирани в 77 фигури и 3 таблици. Като цяло работата е написана ясно и точно и се стреми да бъде максимално изчистена от технически грешки.

От литературния обзор обикновено очакваме да следва плътно направеното в следващите глави като ги подплати от гледна точка на натрупания досега изследователски опит по света. В настоящата дисертация това не е точно така. Литературната справка следва темата на дисертацията по-общо и от по-голяма дистанция, но веднага трябва да кажа, че го прочетох с интерес и впечатлението ми от него е положително. Всъщност, направеното досега в света относно конкретните резултати на работата е включено в главата „дискусия“ под формата на сравнителен анализ, който прави много добро впечатление. Тази глава, изнесена накрая, непосредствено преди изводите, е едно удачно решение, тъй като събира и критически анализира всичко направено, което иначе се разсейва в големия обем разнородни по характера си изследвания и резултати.

Ще отбележа някои неточности или пропуски, които забелязах при прочита на работата:

— Една част от тях се наблюдават в литературния обзор и вероятно са следствие от превод, но точният изказ на български е също така белег, че дисертантката владее материала. Ето някои примери:

1. Неясно и тромаво звучат последното изречение на стр. 19 и първото на следващата стр. 20. Проникването на веществата става в порьозната структура на биофилма без непременно да минават през клетките, за това ли става дума? Целият пасаж е трудно смилаем и може да се формулира много по-стегнато и точно на български.
2. На стр. 23 над Фиг.5 пише: „Дебелината на биофилма ще достигне равновесие, когато плаващите отделени клетки се простират навън в турбулентния поток”. Освен тромавия изказ бих попитала: а ако потокът не е турбулентен, няма ли да достигнем до въпросната дебелина на биофилма?!
3. На стр.24 най-горе: „Градиентът на химикали и йони между микрозоните осигурява снабдяването със субстанции в биофилма”.

Става дума за концентрационен градиент като движеща сила за пренос на различни вещества в биофилма и отново следва да се изглади текстът.

4. На стр.32 в последните две изречения вероятно става дума за междофазната повърхност твърдо-течно, за вида на субстрата, за хидродинамичните условия в течната фаза, за физикохимичните характеристики на средата и не е ясно за кои свойства на повърхността на клетката.
5. Считам, че гл. 2.12.1 следва да се нарече „Влияние на повърхността на носителя”, защото в нея се говори за това.
6. На стр. 34 в последния пасаж т.н. „повърхностна област” би звучала по-разбираемо като достъпната, или развитата повърхност. Аналогично на стр.35 горе, където се говори за грапави повърхности, следва просто да се каже, че развиват по-голяма повърхност.
7. На стр. 65 долу „Повечето материали имат и по-силно изразени еластични свойства, поради което притежават сложна молекулярна структура. Тук причинно-следствената връзка или я няма, или е на обратно: „поради което” е било „тъй като”?

— Друг тип пропуски са някои дефиниции, които, без да са непременно грешни, са непълни или не на място. Например:

1. Обяснението за реометрите на стр.65-66. Изречението „В приложими ситуации те не обхващат като цяло тази симетрия на трансляция” няма никакъв смисъл на мястото, на което е. Целият следващ пасаж е неясен, защото напр. реометрите не показват, а използват въртливо движение. В същност коректно е да се каже, че най-често в реометрите се използват класически едномерни вискозни течения (Кует, Поазьой) в различни координатни системи (вкл. цилиндрична по ъгловата съставяща).
2. Дефиницията на ненютонов флуид на стр. 66 всъщност я няма. Пише, че „някои други материали... имат по-сложно поведение” Предходното изречение визира линейната зависимост напрежение-скоростен градиент при нютоновите флуиди с коефициент на пропорционалност динамичният вискозитет. По-сложното при ‘другите’ материали е, че въпросната зависимост е нелинейна, защото коефициентът на пропорционалност е функция от скоростта на деформация, докато коефициентът на динамичен вискозитет, както правилно е казано, зависи от вида на флуида, температурата и налягането. Т.е. при материали, които се отклоняват от нютоновото поведение, т.н. привиден вискозитет зависи от полето на скоростта. Тъй като по-нататък в дисертацията ще има реологично изследване и ще се говори за вискоеластични флуиди, е недостатъчно да се каже само, че ненютоновите флуиди имат по-сложно поведение.

Относно съществуването на работата имам следните въпроси и забележки:

1. Фиг.31 на стр. 85 е коментирана чисто констативно: наблюдава се задържане при изчерпване на глюкозата от биофилма върху носител PAN PAA + САВ. Има ли някакво обяснение за наблюдаваното стъпало? Според мен такова има и при свободните клетки в същия времеви диапазон (Фиг.30), а няма при биофилма на PAN PAA + САВ+ТВОТ, въпреки, че коментарът там е различен.
2. При анализ на резултатите в параграфи 2.4. и 2.5 съпоставката на кривите за изчерпване на субстрат (фенол, бензилов алкохол, Фиг.34,35, 36, 40, 41, 42) с тези на нарастване на биомасата (Фиг.32, 33, 40) показват много високи добивни коефициенти $\frac{\Delta X}{\Delta S}$ от порядъка на 8 до 19, при това само при концентрация 0.3mg/ml. Ако това е вярно, то този щам следва не да се използва с цел разграждане на фенол, а фенолът да се използва като субстрат с цел натрупване на биомаса. При концентрация 0.1 mg/ml е измерено нарастване от 0.8mg/ml без никакво изчерпване на субстрата, който е посочен като единствен въглероден източник. Това изглежда физически несъстоятелно.
3. Как обяснявате ролята на метала (Ti) в матрицата (PAN+PAA)+САВ+ТВОТ? В резултатите с нея се отчита положителен ефект, свързан с по-грапава (124 стр.) и респ. по-развита повърхност и по-голяма плътност на формирания биофилм (стр. 115). Избраната методика за получаване на тази матрица позволява ли вариране на съдържанието на метала?
4. Прави положително впечатление разнообразието от физични методи, използвани при изследването на биофилмите. В кой аспект от техните приложения вискозните и еластични свойства биха били важни?
5. На стр. 119 в параграф 1 се казва „новосинтезирани хибридни мембрани“. Това се съдържа и в първия от изводите на стр.133. Този извод, обаче, не е защитен убедително в текста – нито при описанието на синтезите в глава 3.2, нито в дискусията. Мисля, че работата само би спечелила от малко повече коментар в тази посока.

Относно направените изводи в дисертацията имам още следните забележки:

1. Извод 7 не съответства на показаното на Фиг.50 и 54 (стр. 99 и 102). От тези фигури може да се направи отрицателен извод за възможността да се прилагат биофилми от *Saccharomyces cerevisiae* при алкохолна ферментация. По-добра е ситуацията при използване на ензимен хидролизат и матрица (PAN+PAA)+САВ, но пак резултатите са около 2 пъти по-ниски. Впрочем, сравними ли са условията при двата типа експерименти относно началната концентрация на клетките, температурата и pH?

2. Двата извода в раздел II относно визуализацията са твърде оскъдни на фона на използваните четири различни метода. На първия извод за това, че всички матрици са подходящи за формиране на биофилми, липсва продължението: защото... Кои са критериите за подходяща матрица, които могат да се проверят чрез визуализация на биофилма? Вторият извод просто не следва да го има, тъй като не тук се установява за първи път, че тези методи са недеструктивни.

Положителните страни на дисертационния труд могат да бъдат обобщени така:

1. Широк обхват на изследването. Това включва голям обем експериментален материал, получен в резултат на различни методи на изследване и даващ по-цялостен поглед върху поведението на получените биофилми. Започвайки от синтеза на матриците, през формирането на биофилмите, визуализацията и характеристиката на техните структури, изследването на кинетиката на нарастване на клетъчна маса, до приложението им в конкретни, важни за практиката процеси – всичко това показва широк поглед върху проблема, защитен професионално и представен убедително с богато количество резултати.
2. Дисертационният труд отговаря на поставените цел и задачи. Изследването е методично издържано.
3. Работата е много добре структурирана и въпреки забележките, които направих в началото, като цяло тя прави много добро впечатление и се чете с лекота, тъй като материалът е поднесен в правилната последователност и с необходимата и навременна аргументация.
4. Използвани са съвременни методи за визуализация на биофилмите и изследване на техните структури и свойства. Това прави положително впечатление и искам да го подчертая, защото рядко са случаите, когато докторските дисертации излизат смело на нова интердисциплинарна територия, при това не самоцелно, а интегрирано в една цялостна визия за проблема и възможностите за неговото решение.
5. Главата „Дискусия“, респективно коментарите и подготвените сравнителните таблици в нея, допринасят за открояване на всички значими резултати на изследването. Тя показва познаване на литературните източници и предхождащия опит, както и набелязва насоки за бъдещо развитие на изследванията в тази област.
6. Изводите и приносите имат научно-приложен характер. Те са ясно формулирани и правилно отразяват обема и качеството на проведените изследвания.

Публикационната активност на инж. Десислава Маринкова заслужава висока оценка:

1. Представени са 6 публикации в пълен текст и 8 участия в конференции и симпозиуми.
2. Четири от публикациите са в списания с импакт-фактор. Впечатлява високият импакт фактор на две от тях (2.975).
3. Вече има четири цитата на публикуваните резултати.

Забележка към тази част от работата може да бъде само големият брой съавтори (16 общо). Отчитам, обаче, че става дума за много разнородни по тип изследвания и ползване на лаборатории извън територията на кат. "Биотехнология".

Личните ми впечатления от инж. Десислава Маринкова датират от времето, когато бе студентка в ХТМУ. Инж. Маринкова е възпитаник на кат. „Биотехнология“, в която завършва бакалавърска и магистърска степен съответно през 2002 и 2004г., а от март 2005г. е зачислена като редовен докторант към същата катедра. След изтичане на срока на аспирантурата с малки прекъсвания тя продължава да работи в същата катедра, където в момента е асистент. Биографичната справка на дисертантката впечатлява с преподавателската и научноизследователска активност. През годините съм имала многократно случаи да контактувам с нея като докторант и асистент в катедрата и винаги съм оставала с впечатлението за един отзивчив и приветлив човек, активен, мотивиран и коректен в работата си научен работник.

Считам, че дисертацията представя едно качествено научно изследване, защитено от богат и разнообразен експериментален материал, проведено с вещина и професионализъм, както и с многостранен и в същото време задълбочен поглед върху проблема. Дисертационният труд напълно отговаря на изискванията за образователната и научна степен „доктор“ и аз подкрепям нейното присъждане на инж. Десислава Маринкова-Калоянова.

