

РЕЦЕНЗИЯ

**на дисертационен труд на Десислава Антонова Маринкова-Калоянова
на тема „Изследвания бърху формирането, структурата и приложението
на биофилми” за присъждане на образователна и научна степен „доктор”
по научна специалност 01.05.10 „Биоорганична химия, химия на
природните и физиологично активните вещества”
Рецензент: проф. д-н Цонка Иванова Годжевъргова
Катедра Биотехнология при Университет „проф. д-р А. Златаров”**

Предоставеният ми за рецензия дисертационен труд се отнася до изследване формирането и структурата на биофилми от клетки на грам отрицателни, грам положителни бактерии и дрожди с оглед възможности за приложение на получените биофилми в биотехнологични процеси.

1. Актуалност на проблема

Биофилмите са широко разпространени сложни системи със специфични физични и биологични свойства, с особена динамика на спонтанно възникване, развитие и структура, което дава основание за повишен научен интерес към тях и конкретно изучаване на всеки един биофилм, в зависимост от вида на микроорганизма. Преднамерено предизвикана и управлявана в производствени условия спонтанната фиксация на биофилма може да бъде използвана за създаване на високоефективни индустриални системи. Използването на биофилми води до многократно увеличаване на скоростта на биопроцесите, което е причина за големия технологичен интерес към тях и непрекъснато нарастващия брой научни изследвания. Съществуват много публикации относно формирането и развитието на биофилми от различни микроорганизми, но в научната литература има малко данни за изследвания относно механичните свойства на биофилмите – якост, еластичност, изнosoустойчивост.

2. Преглед на дисертационния труд и анализ на резултатите

Дисертационният труд е написан в съвременна област на научното познание – биофилмови системи и третира актуални проблеми, което го

прави дисертабилен. Дисертацията е структурирана и написана по общоприетия начин с обем 147 страници. Тя съдържа разделите: Литературен обзор, Цел и задачи, Материали и методи, Резултати, Дискусия, Изводи, Научни приноси и Литература.

Литературният обзор е оформен на базата на 186 литературни източника, от които само 3 на кирилица. Над 50% от тях са публикувани след 2000 г., което показва актуалността на проблема и в международен мащаб. Обзорът съдържа богата, добре структурирана и подредена информация върху разглежданите проблеми. Той е в пряка връзка с експерименталната работа и илюстрира информираността и компетентността на докторантката по темата на дисертационния труд. Чрез него са изяснени някои по-общи въпроси за структурата и свойствата на биофилмите: формиране и развитие на биофилмите, биохимия на бактериите от биофилма и фактори влияещи върху прикрепянето и развитието на биофилма. Подробно са описани структурните характеристики и свойствата на използваните в експериментите бактерии *Arthrobacter oxydans* 1388 и *Pseudomonas species* 1625 и дрождите *Saccharomyces cerevisiae*. По мое мнение дисертационният труд щеше да спечели, ако докторантката беше направила заключение на литературния обзор, в което тя да обобщи постигнатите резултати от други автори в изследваната област и да мотивира целта на своето изследване.

Изследователската част на дисертационния труд е разработена в следните основни направления:

1. Изследвания върху формирането на биофилми от клетки на щам *Arthrobacter oxydans* 1388 върху синтезираните мембрани, кинетика на продуциране на общи белтъци и полизахариди и приложение на формираните биофилми.
2. Изследвания върху формирането на биофилми от клетки на щам *Pseudomonas species* 1625 върху синтезираните мембрани, кинетика

на продуциране на общи белтъци и полизахариди и приложение на формираните биофилми.

3. Изследвания върху формирането на биофилми от клетки на *Saccharomyces cerevisiae* върху синтезираните мембрани, кинетика на продуциране на белтъци и полизахариди и приложение на формираните биофилми.

4. Визуализация на синтезираните мембрани и получените биофилми от щамовете *Arthrobacter oxydans* 1388, *Pseudomonas species* 1625 и клетки на *Saccharomyces cerevisiae* с помощта на сканираща електронна микроскопия, плазмонна микроскопия, микроскоп на пълно вътрешно отражение и оптична микроскопия.

5. Охарактеризиране на получените подходящи носители за биофилми и формираните биофилми по отношение на реологичните им свойства с помощта на измервания с QCM.

В раздела „Материали и методи“ акуратно са посочени използваните методики, разположени на 25 страници - методики за култивиране на микроорганизмите, синтез на носителите за формиране на биофилми, метод за изливане на мембрани, методиките за формиране на биофилми, и аналитични методики за охарактеризиране и приложение на получените биофилми. В тази част имам следните забележки. Вероятно поради технически грешки в една от методиките (III.4) и в част Резултати (стр.77, 81) не става ясно мембрани или гранули се поставят в културалната суспензия за формиране на биофилма, тъй като докторантката използва израза гранулирани матрици. Не са описани подробно методиките за получаване на мембрани, каква е концентрацията на полимерите, какви са характеристиките на получените мембрани – размер на порите, дебелина на мембраната, какви са размерите на мембраната в културалната суспензия.

В тази част на дисертацията много подробно са описани високоефективни и прецизни методи използвани за визуализация на биофилмите като сканираща електронна микроскопия, плазмонна микроскопия, микроскоп с пълно вътрешно отражение и оптична микроскопия.

В разделите „Резултати“ и „Дискусия“ на първо място е проследена кинетиката на нарастване на биофилми от клетки на *Arthrobacter oxydans* 1388 върху различни полимерни матрици и кинетиката на продуциране на белтъци и полизахариди и е установено, че най-подходящи матрици са тези получени от съполимер на AN и AA и смес от същия съполимер и САВ. Не е правилно за съполимера да се използва аббревиатура PAN + PAA, тъй като съполимера се образува от редуването на двата мономера в полимерната верига. Полученият биофилм е приложен за разграждане на амониев хлорид.

На второ място е изследвана динамиката на нарастване на биофилми на щам *Pseudomonas species* 1625 върху матрици от съполимер на AN + AA и САВ, както и същата матрица, но съдържаща метален прекурсор в състава. Установено е, че по-голямо количество белтъци и полизахариди се синтезират от биофилма синтезиран върху матрицата съдържаща метал. Биофилмите на *Pseudomonas species* 1625 са приложени за биодеградация на фенол и бензилов алкохол присъстващи самостоятелно и в смес. Установено е, че при култивиране на биофилмите в смес на фенол и бензилов алкохол, фенолът се разгражда в по-голяма степен в сравнение с култивирането в самостоятелните реагенти.

На трето място е изследвана динамиката на нарастване на биофилми от клетки на дрожди *Saccharomyces cerevisiae*, както и продуцирането на белтъци и полизахариди от формираните биофилми върху матрици образувани от смес на съполимер на AN и AA и САВ, както и същата матрица, но съдържаща метален прекурсор в състава. И тук

докторантката е установила, че матрицата с метала е по-подходяща за формиране на биофилм. Получените биофилми са приложени за провеждане на алкохолна ферментация на глюкоза и два вида лигниноцелулозни хидролизати.

В частта „Резултати“, в някои фигури се забелязва, че липсва корелация между растежа на щам и консумацията на глюкоза – фиг.31/фиг.27 и между растежа и изчерпването на фенол фиг.32/фиг.34. Има несъответствия между часовете описани в текста и часовете дадени във фигура 28. В дисертацията е пропуснато да се посочи номера на щам *Saccharomyces cerevisiae*.

Накрая изследваните биофилми са визуализирани чрез различни съвременни микроскопски техники и са изучени техните реологични характеристики чрез кварцово-кристална микровезна, и ултразвукова техника. Тези изследвания имат висока научна стойност, тъй като реологията на биофилмите е слабо изучена. Визуализацията на биофилмите с плазмонната микроскопия и микроскопа на ПВО позволява наблюдение в реално време, което е много важно предимство за тези методи.

В заключителната част са направени 12 обобщени извода, в които са резюмирани резултатите от изследванията по поставените задачи. Те произтичат изцяло от експерименталните резултати. Дисертацията би спечелила, ако в изводите бяха цитирани по-конкретни данни относно получените резултати. Държа да отбележа, че направените бележки в рецензията не са от съществен характер и не влияят по никакъв начин върху общото ми впечатление за една добре извършена работа от докторантката. Освен това извършена е голяма по обем експериментална работа и съответно е налице значителна научна продукция.

3. Характеристика и оценка на приносите на дисертационния труд

Научните постижения в докторската дисертация са представени чрез формулираните седем научно-приложни приноси. Към най-значимите **приноси** на дисертационния труд могат да се отнесат:

1. Формирани са биофилми на щамове *Arthrobacter oxydans* 1388 и *Pseudomonas species* 1625 и дрождите *Saccharomyces cerevisiae* върху нови хибридни полимерни мембрани и са охарактеризирани по отношение на динамика на нарастване на биофилма и продуциране на белтъци и полизахариди.

2. Проучено е приложението на биофилмите на клетки на щам *Pseudomonas species* 1625 за биодеградация на фенол и бензилов алкохол и на клетки от *Saccharomyces cerevisiae* за алкохолна ферментация.

3. Получени са нови визуални и реологични характеристики на изследваните биофилми.

Тези приноси могат да бъдат отнесени към категорията приноси, чрез които се обогатяват съществуващи теоретически и практически знания в областта на формирането, развитието и приложението на биофилмите. Много съществени са изследванията относно визуализацията и най-вече върху реологичните свойства на биофилмите, тъй като в научната литература има малко изследвания в тази област.

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

Резултатите от дисертационния труд са публикувани в 5 публикации, от които 4 в чужди списания и една публикация в национално специализирано списание и всички са с импакт фактор. Статиите са в съавторство, като в две от тях кандидатката е на първо място, а на останалите на второ място. Няма никакво съмнение, че докторантката е самостоятелна и има съществена роля при оформянето на резултатите и публикуването на статиите. В една от публикации докторантката е в съавторство с чужди автори и това е доказателство за постигнати добри научни резултати и за тяхното

разпространение. Посочени са 4 цитати на публикациите от кандидатката. Големият брой участия на дисертантката в конференции и симпозиуми (8 броя) показва едно много добро популяризиране на научните резултати.

5. Оценка на съответствието между автореферата и дисертацията.

Авторефератът е в обем 70 страници и е със структура и съдържание, съответстващи на раздела.

6. Въпроси към докторантката:

1. Защо са подбрани точно този вид хибридни полимери за матрици на биофилмите? Как би повлиял повърхностния заряд на изследваните полимерни мембрани върху образуването на биофилмите от използваните от Вас микроорганизми.
2. Имате ли изследвания за стабилността на биофилма при различна скорост на разбъркване на клатачния апарат?

Заклучение

В дисертационния труд на Десислава Маринкова-Калоянова се разглеждат важни и актуални въпроси. В процеса на разработване на дисертацията си докторантката е разширила и задълбочила своите знания в областта на формирането и приложението на биофилми. Придобила е умения да събира и обработва научна информация, да планира и извършва експериментална дейност и да анализира и обобщава получените резултати. По начина на разработване, структура, обем и съдържание и постигнати научно-приложни приноси представеният дисертационен труд отговаря на изискванията за докторска дисертация, което е основание да предложи на Научното жури да оцени положително научния труд и да присъди на Десислава Маринкова-Калоянова образователната и научна степен „доктор” по научна специалност 01.05.10 „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества”.

27 февруари 2012 г.
Бургас

Рецензент:.....
/проф. д-н Ц. Годжевъргова/