

РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“ по научна специалност: 02.11.11 „Технология на биологично активните вещества“

Тема на дисертационния труд: „Изследване на физиолого-биохимичните характеристики и биологичната активност на щамове от род *Bacillus* при биоконтрол на растенията“

Автор: Цветана Валентинова Личева, редовен докторант към Биологическия факултет на СУ „Св. Кл. Охридски“

Рецензент: доц. д-р Пенка Желязкова Вълчинкова, Институт по царевицата – гр. Кнежа, определена за член на научно жури съгласно заповед № РД 38-293/09.05.2013 г. на ректора на СУ „Св. Кл. Охридски“

Обща характеристика на дисертационния труд

Дисертацията е напълно завършен научен труд, оформен и структуриран по класическия модел, основаваща се на значителен по обем експериментален материал и научно издържана интерпретация на фактите. Представеният дисертационен труд съдържа 138 страници, включващ 21 таблици и 41 фигури, от които 19 таблици и 35 фигури отразяват експериментални данни. Списъкът на цитираната литература е от 196 източника (17 стр.) с включени 11 заглавия на кирилица и 185 на латиница.

Настоящата дисертация представлява научен труд с всички задължителни за подобен тип разработка основни раздели: Увод (1 стр.), Литературен обзор (37 стр.), Цел и задачи (2 стр.), Материал и методи (14 стр.), Резултати и обсъждане (56 стр.), Изводи (2 стр.), Приноси (1 стр.), Списък на научни публикации (1 стр.) и Приложения (7 стр.).

От горепосоченото е ясно, че дисертацията е структурирана правилно, в съответствие със задължителните за такива изследвания изисквания. Литературният преглед не превишава 30% от целия обем, а с най-голям такъв е основния раздел „Резултати и обсъждане“.

Актуалност на проблема

В условията на съвременното развитие на селското стопанство все по-наложително е да се търсят приоритети и алтернативи на конвенционалното земеделие. Добри възможности и алтернативи предлага

биологичното земеделие, което отговаря на изискванията за ефективно и екологично безвредно удовлетворяване потребностите на растенията. Този тип земеделие има основни преимущества, които го правят привлекателно и прогресивно развиващо се в световен мащаб. В България са налице благоприятни почвено-климатични условия за развитието на биоземеделието. След 1999 г. по нормативен път у нас е разрешено производството, преработката и маркетинга на биологичните продукти. В последните години значителна част от научните изследвания са насочени към приложения в растениевъдството на препарати, получени по биотехнологичен път. Наблюдава се повишен интерес към представителите на род *Bacillus*, голяма част от които се използват като компоненти на микробиални препарати при биоконтрола на фитопатогенни бактерии, причинители на икономически важни болести, за подпомагане растежа и развитието на културни и декоративни видове, подобряване на минералното хранене, повишаване на добива и качеството му.

В този контекст предоставеният ми за рецензиране дисертационен труд, разглеждащ проблеми относно изследвания на физиолого-биохимични характеристики и биологичната активност на щамове от род *Bacillus* при биоконтрол на растения, разкрива значителен потенциал за използване на получената информация в научен и приложен аспект.

Считам, че направеният избор на темата е актуален и иновативен, защото всяко изследване, насочено към изясняване същността на разглежданите проблеми, създава реални възможности за конкретни отговори при решаването на предизвикателства, наложени от съвременното развитие на биоземеделието в България. Ето защо оценката ми за актуалност е положителна.

Литературна осведоменост на докторанта

Литературният обзор е доста изчерпателен и е представен в обем от 37 страници, обособен в 6 раздела. Прегледът на литературата, който се базира общо на 196 заглавия, от които 11 на кирилица и 185 на латиница, като цяло заслужава положителна оценка. Представен е в издържан и добър научен стил, литературните източници са цитирани коректно както в текста, така и в списъка на литературата. Докторантката показва добра осведоменост в областта на разработваната тематика и способност за анализ на литературния материал. В подкрепа на това твърдение е фактът, че след 2000 г. присъстват 86 заглавия на латиница (около 46% спрямо общия брой), които сочат акценти, фокусирани върху научните проблеми, най-тясно свързани с поставените цели и задачи. Това е добър атестат за нивото на теоретичните познания на докторантката и съдържат достатъчно актуална информация за постиженията до момента в изследваната област. Към този раздел единствената ми забележка е относително niskия дял на

цитираните на кирилица източници, главно от популярни списания и учебници. Желателно е в дисертацията да се използват повече цитати от научни списания и сборници и по-малко от популярни, което е препоръка и към бъдещата работа на докторантката. Възможно е научни разработки да са публикувани в популярни издания и точно те да са отразени като литературни източници, така че критиката ми да е относително неоснователна. Целта на изследването е кратка, точна и ясно отразява същността на проучването. Деветте задачи, поставени за изпълнение, отговарят изцяло на основните направления на изследването, както и на представената конкретна информация в литературния обзор.

Оценка на методичната част

Разделът „Материал и методи“ съдържа обем от 14 страници. Подробното описание на последователността на етапите на научноизследователската работа дава възможност да се добие представа за големия обем и трудоемкостта на разработката. Избрани са подходящи методи и подходи, чрез които се реализират поставените в дисертацията цели и задачи и които според мен са правилни. Трябва да се оценят по достойнство усилията, които полага докторантката при овладяването и безупречното прилагане на един наистина богат арсенал от изследователски методи и техники, включващи различни типове лабораторни анализи, вегетационно-съдови опити, биометрични измервания при съответните тест-растения. Идентифицирането на шестте новоизолирани щамове от род *Vacillus* чрез съвременни методи, в т. ч. и молекулярно-генетични и по-нататъшното им изпитване за доказване на биологичния им ефект върху голям брой тест-растения *in vivo* считам за много удачен и ефективен методичен подход и модел, което оценявам високо положително. Силно впечатление прави големия брой на сметите показатели, оценени и анализирани в хода на проучването. Крайният резултат е постигане на високо научно-методично ниво, което е съществена основа за по-нататъшното научно израстване на докторантката.

Раздел „Резултати и обсъждане“

Резултатите, получени при провеждането на серия от експерименти, са групирани в 9 направления, следващи последователността на задачите и целта на дисертационната разработка. Представените данни са интерпретирани в обем от 56 страници, съдържащи добре и коректно оформен илюстративен материал от 19 таблици и 35 фигури, включително и снимки от някои опити. Въпреки големия експериментален обем, от получената информация се очертават две основни насоки на изследователската работа – първата свързана с изолирането, охарактеризиране и пълното идентифициране на нови щамове от род

Bacillus, а втората с изследването и доказването на биологичната им активност от възможно повече гледни точки и голям брой тестове върху почви и *in vivo* растения, подробно обсъдени и отбелязани в методичната част. В този контекст безспорни са усилията на докторантката при реализирането на тази амбициозна и трудоемка научна програма. По моя преценка с особено внимание и тежест са резултатите, получени от раздела, посветен на изолирането и охарактеризирането на щамовете от род *Bacillus*. Те са ценни и съдържат много значима информация за пълната таксономическа характеристика на новите щамове, обозначение условно като *Bacillus subtilis* T₂, *Bacillus amyloliquefaciens* T₃, *Bacillus subtilis* T₄, *Bacillus subtilis* T₁₀, *Bacillus thuringiensis* T₁₇ и *Bacillus cereus* T₁₈. Поради високата степен на сходство на голяма част от видовете на род *Bacillus* направените фенотипни и физиолого-биохимични характеристики са комбинирани с молекулярно-генетични. Този подход осигурява високодостоверно разграничаване и идентифициране принадлежността на изследваните щамове.

Въпреки че щамове T₂, T₄ и T₁₀ показват принадлежност към вида *Bacillus subtilis* с висока достоверност от мелекулярно-генетичния анализ, те се различават по своите морфологични и физиолого-биохимични характеристики.

Едно от достойнствата за качествата на новоизолираните щамове е анализът на данните от скрининга за антимикробно действие чрез изпитване на щамовете по метода на дифузия в агар и върху *in vivo* *Lycopersicon sativum* (домат) срещу фитопатогенните бактерии *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* и *Xanthomonas vesicatoria*. Получените данни са интересни от научна и практическа гледна точка, главно поради възможността да се използват като агенти за лечение на симптоми, причинени от фитопатогенни бактерии при някои растения. Доказано е при обект *in vivo* (домат), че изследвания щам T₄ проявява протекторно и терапевтично действие срещу фитопатогенната бактерия *Clavibacter michiganensis*. Данните имат потвърдителен характер и могат да се използват като критерий при селекция на щамове като компоненти на биопрепарати и за превенция и контрол на фитопатогени.

Данните за технологичната характеристика също намират своето място в изследванията от гледна точка установяване на подходящи среди за натрупване на най-голямо количество биомаса и най-висока преживяемост на изследваните щамове при лиофилизация. Установените среди ПДГ и среда с протектор 10% соево мляко при лиофилизация са резултати с практическо значение и разкриват потенциал за използването им като пълнители при производство на сухи микробиални препарати, приложими в растениевъдството. Във връзка с определяне на възможностите на изследваните щамове за приложението им като съставна част на биоторове са получени данни от изследване на ензимния им

профили с APIZYM система. Резултатите са потвърдителни и свидетелстват за висока фосфатазна активност, проявена от всички изследвани щамове. Тази характеристика заслужава положителна оценка, защото съдържа полезна информация относно производството на биопрепарати с цел подобряване на фосфорното хранене, респективно растежа и развитието на растенията.

Доста обширна част от проучванията е посветена върху изследванията на мобилни форми фосфор в третиран с шестте щамове почви – самостоятелно и върху растителен обект *Pelargonium zonale* (мушкато). Доказано е, че щамовете от работната колекция повишават мобилността на фосфора при излужено-черноземни почви, третиран с трудно достъпен източник на фосфор (фосфоритно брашно), т.е. те се проявяват като фосфат разграждащи бактерии, особено ясно изразено при щамовете T₂, T₄ и T₁₀. При моделен обект *Pelargonium zonale*, избран като много подходящ за целите на изследването, чрез вегетационно-съдови опити е получен голям обем от данни в резултат на проследяване на серия от показатели: агрохимични, съдържание и усвоени макроелементи, доста биометрични измервания. Те са систематизирани и коректно представени таблично, графично и чрез снимков материал, което улеснява възприемането на големия обем информация.

Анализът на резултатите показва, че е констатиран положителен ефект върху декоративния вид на изследвания тест-обект (мушкато) при инокулиране с щамове: T₃, T₄, T₁₀ и T₁₈ в резултат на подобреното фосфорно хранене. Следователно данните успешно могат да се използват при решаване проблеми на минералното хранене на някои растителни видове.

Сериозно внимание е обърнато на проследяване ефекта на щамовете върху растежа и развитието на растения *in vivo* в условия на вегетационно-съдови опити. При обект *Pelargonium pelthatum* (сакъзче) са снети голям брой биометрични данни. Установен е положителен стимулиращ ефект при щамовете T₂ и T₄ при наблюдаваните показатели. Опитни растения от *Pisum sativum* и *Lycopersicon sativum* (домат) са инокулирани с всички изследвани щамове със същата посочена по-горе цел. При тях са получени данни, доказващи чрез резултатите за надземната и коренова биомаса, че е проявен положителен ефект върху генеративното развитие на тест-растенията при третиране с щамовете: T₃, T₄ и T₁₈. Този раздел също е обемен и трудоемък за изпълнение, но разкрива други страни и перспективи за приложение на колекцията от новоизолирани бактериални щамове, което е важно за растениевъдството.

Немалка част от резултатите засягат изследвания, отнасящи се до определяне на оптималната концентрация за биологична доза – ефект на изследваните щамове върху тест-растеният *Cucumis sativum* (корнишон) чрез хипокотил тест; *Euphorbia pulcherrima* (коледна звезда) и

Licopersicum sativum (домат). Демонстриран е най-висок положителен ефект върху коледната звезда при третиране с комбинация от щамове T₂, T₃, T₄ и T₁₀ с доза 2 ml/l като потенциален бактериален препарат, особено важен и ценен резултат от дисертационния труд. Новите шест щама са изследвани чрез LC-MS анализ за съдържание на растежни регулатори в културални течности предварително, след което чрез повторен анализ на два от тях (T₂ и T₄) е установено, че те синтезират физиологично активни вещества с фитохормонално действие – гиберилини и абсцисинова киселина и някои други БАВ.

Щамовете T₂ и T₄ са интересни заради способността им да синтезират фитохормони и да се използват в перспектива като компоненти на биоторове за стимулиране растежа и развитието на растенията.

Някои от изводите са конкретни (6, 7, 11), други обобщаващи (8, 9), но всичките 11 извода, формулирани в дисертацията, носят съответната ценна информация по проучените проблеми. Те са в основата на приносите на дисертацията, отразени в приложената справка.

Оценка на приносите

Те са оформени в 5 точки и кореспондират с резултатите от експерименталната работа. По моя преценка не е достатъчно ясно изтъкнато и подчертано кои от тях представляват новост, оригиналност и ценност, което считам за пропуск и известен недостатък. Приемам за оригиналност и новост приноси 1 и 2, които са съществена основа на останалите, защото:

1. С изолирането на 6 вида от род *Bacillus* от различни типове почви на Република България - *Bacillus subtilis* T₂, *Bacillus amyloliquefaciens* T₃, *Bacillus subtilis* T₄, *Bacillus subtilis* T₁₀, *Bacillus thuringiensis* T₁₇ и *Bacillus cereus* T₁₈ е създадена **нова** колекция от щамове, притежаващи ценни за биологичното земеделие качества, която предстои да бъде депозирана в НБПМКК (принос 1).
2. Като нови и оригинални считам също така биологичните и технологични характеристики на изолираните щамове от род *Bacillus*, които ги определят като подходящи за технологичното приложение в биологичното земеделие (принос 2).

Останалите приноси са с научно-приложен характер и разкриват възможности за използването им като биоконтролни агенти срещу фитопатогенните бактерии *Clavibacter michiganensis*, subsp. *michiganensis* и *Xanthomonas vesicatoria* (№ 3), притежаващи потенциал като компоненти на микробиални торове във връзка с фосфорното хранене на опитен обект *Pelargonium* (№ 4) и като регулатори на растежа на растенията (№ 5).

Имам и някои критични бележки, които по-скоро целят подобряване на бъдещата научна работа на докторантката. Огромният обем от информация е предпоставка за допускане на известни слабости, като:

оскъдна дискусия при обсъждането на някои резултати, особено що се отнася до сравняване с резултати, получени от български автори. Подобно впечатление се създава и от цитираните заглавия в литературния обзор. Вероятно обяснение за това е огромния фактологичен материал, но според мен високата осведоменост на докторантката предполага при някои интерпретации по-задълбочен коментар на данните.

Оценка на автореферата

Представеният автореферат отразява обективно съдържанието на дисертационния труд, но е прекалено голям по обем, без номерирани страници. Практически раздел „Резултати и обсъждане“ почти се дублира с този от дисертацията, което считам за недостатък, защото основната идея за подобен тип разработка е в най-синтезиран вид да се отразят всички структури на дисертацията. Още повече, че е налице възможност за прецизен избор като се има предвид богатият илюстративен материал, позволяващ подобен подход. Въпреки тези критични бележки, като цяло приемам автореферата.

Оценка на публикациите по дисертационния труд

Във връзка с дисертацията са отбелязани 4 цялостно публикувани научни трудове и 3 резюмета от участия в научни прояви, в които докторантката е първи автор. Това ми позволява да оценя високото ниво и активното участие в проявите от републиканските и международни форуми, което е много добър атест за израстването ѝ като научен работник.

Заклучение

Въз основа на дисертационния труд по отношение актуалността, усвоените и приложени методи, правилно изведени експерименти, направено обсъждане, обобщения, изводи, оригиналният характер на приносите, считам че дисертационния труд **„Изследване на физиолого-биохимичните характеристики и биологичната активност на щамове от род *Vacillus* при биоконтрол на растенията“** напълно отговаря на изискванията на Закона за развитие на академичния състав на Р. България и Правилника за неговото приложение, поради което **оценявам положително дисертационния труд** и ще гласувам с „Да“ редовният докторант

Цветана Валентинова Личева да получи образователната и научна степен „Доктор“ по научна специалност 02.11.11 Технология на биологично активните вещества, **която тя напълно заслужава.**

10.06 2013 г.
гр.Кнежа

Рецензент:
/доц. д-р Пенка Вълчинкова/