

## РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационния труд на **Михаела Руменова Алексова** на тема: „**Микробиологична оценка на резистентността и устойчивостта на почви, третирани с фунгицида азоксистробин**“ 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, научна специалност: Екология и опазване на екосистемите – Екология на микроорганизмите

**Рецензент:** проф. д-р Румяна Миронова – ИМБ „Академик Румен Цанев“ – БАН

През последното десетилетие се наблюдава тенденция за нарастване на употребата на пестициди в земеделието в световен и национален мащаб, което неизбежно води до замърсяване на околната среда. Тази тенденция се отнася и до използването на стробилурновия фунгицид азоксистробин, лансиран за първи път на немския пазар през 1996 г. Днес той е активна съставка в различни търговски препарати и е разрешен за употреба в 100 страни. Азоксистробинът е системен фунгицид с широкоспектърно действие, който се отнася към групата на умерените до силно устойчиви в почва агрохимикали с време на полуразпад над 250 дни. С препаратите на основата на азоксистробин се третират обикновено листа и семена, но те се прилагат също така за профилактична обработка на почви. Дори когато се прилага като листен спрей над 50% от препаратите се отлагат в почвата. Независими изследвания показват, че азоксистробинът оказва неблагоприятни ефекти върху почвата и почвените микробни съобщества, които са определящи за почвеното здраве и плодородие. Тези изследвания обаче са оскъдни и често противоречиви. Това определя актуалността и значението на дисертационния труд на Михаела Алексова, който ни предлага едно комплексно и задълбочено изследване на влиянието на азоксистробина върху почвения микробиом.

Дисертацията включва разделите „Увод“ (2 стр.), „Литературен обзор“ (34 стр.), „Цел и задачи“ (1 стр.), „Материали и методи“ (20 стр.), „Резултати и обсъждане“ (132 стр.), „Обобщение“ (9 стр.), „Изводи“ (2 стр.), „Приноси“ (1 стр.), „Литературна справка“ (15 стр.) и „Приложения“ (7 стр.). Прекалено големият обем на глава „Резултати и обсъждане“ (132/227) внася известен дисбаланс в структурата на дисертацията. Този раздел според мен би могъл да се съкрати за сметка на някои анализи с потвърдителен характер и прекалено подробното представяне на експерименталните данни. Например, за резултатите от фингерпринтинг техниките е достатъчно да бъдат показани само съответните рестриктазни профили без изолираните метагеномни ДНКи и получените с тях амплификационни продукти. Също така смятам, че „Обобщението“ от 9 стр. можеше да бъде заменено от едно много по-кратко, до 2 стр. „Заклучение“, тъй като направеното обобщение повтаря до голяма степен информацията, съдържаща се в глава „Резултати и обсъждане“. Литературната справка включва 220 източника, от които само 5 на български език като доминират цитати от последното десетилетие, което свидетелства за едно добро познаване на съвременната научна литература от докторантката и свободно боравене с нея. Документалният материал достатъчно точно и убедително онагледява докладваните резултати и наброява 128 фигури, една много прегледна (неномерирана) схема на експерименталните изследвания и 17 таблици (без приложенията).

Литературният обзор ни предлага един задълбочен анализ на актуалното състояние на изследванията върху проблематиката на дисертационния труд. В него са обособени три основни точки, отнасящи се до използването на пестициди в земеделието (т. 1), основни тенденции и характеристики в използването на фунгициди (т. 2) и физико-химичните и биологични свойства на азоксистробина (Az) (т. 3). Първата точка акцентира върху основните тенденции в употребата на пестициди в световен, европейски и национален мащаб. Разбираме, че въпреки предприетите мерки за устойчиво използване на пестициди, средната им употреба в Европа не е намаляла като цяло. През 2017 г. у нас е наблюдаван лек спад в потреблението на пестициди, но поради липса на статистически данни за последните години не е ясно дали тази тенденция е трайна или само епизодично явление. Разгледани са абиотичните и биотични фактори, от които зависи устойчивостта на пестицидите в почвата, както и изследователските подходи (ензимни и функционални тестове, молекулярно-генетични подходи и култивационни методи) за оценка на ефектите на пестицидите върху микробиома. Подчертавам, че всички тези изследователски подходи са използвани от докторантката в нейния дисертационен труд. Във фокуса на т. 2 от литературния обзор са фунгицидите като едни от най-често използваните в селското стопанство пестициди, тяхната класификация в зависимост от действието им (лечебно или профилактично) и механизма им на действие (биологични мишени). В световен и Европейски мащаб се ограничава използването на неорганични фунгициди на основата на мед, сяра и живак, тъй като замърсяват почвата с тежки метали и се разраства пазарът на органичните фунгициди. Така е направен логически преход към Az, който принадлежи към групата на органичните фунгициди и на който основателно е посветна основната част от обзора. Направен е обстоен преглед на литературата върху неговите физико-химични и биологични свойства. По механизъм на действие Az се отнася към инхибиторите на митохондриалното дишане, а предпочитаната му употреба се обяснява с широкоспектърния му механизъм на действие, насочен срещу четири групи гъби. Az е нискотоксичен за сладководни и морски безгръбначни и риби, а изследванията за ефекта му върху почвения микробиом са изключително малко. Представени са детайлно наличните, оскъдни и често противоречиви данни за въздействието на Az върху функционалните характеристики (почвените ензими и метаболитната активност) и структура на почвените микробни съобщества, като по-голямо внимание е отделено на ефекта му върху бактерии и гъби, които са предмет на изследване в дисертацията. Анализирани са литературните данни и за обратния ефект на биотичните и абиотични фактори на почвената среда върху активността на Az. Добро впечатление прави обобщаването и представянето в „компресиран“ вид на литературни данни от шест изследвания за ефекта на Az концентрацията върху почвените ензими (Фиг. 1.15). Това, което на мен ми липсва в литературния обзор е кратък преглед на почвени микроби, които са доказани човешки патогени и на ролята на почвеното замърсяване с агрохимикали за придобиването на резистентност към клинично значими антибиотици. Подобен анализ би обосновал по-убедително изследванията, описани в т. 2.3.3 на глава „Резултати и обсъждане“. Обзорът и цялата дисертация са написани на добър езиков и научен стил, имам само следната **ЗАБЕЛЕЖКА** към израза „RISA се базира на PCR амплификация на част от интергенния участък между малката и голямата субединици на рибозомата“ (стр. 13). Интергенният участък не се намира между малката и голяма субединици на рибозомата, а между гените, кодиращи съответните рРНКи.

Целта на дисертацията е убедително аргументирана в светлината на направения литературен обзор и тя е „Да се оцени влиянието на фунгицида азоксистробин, приложен в нарастващи концентрации върху функциите и структурата на микробните съобщества от песъчлива и глинесто песъчлива почви съобразно времето на експозиция“. За постигането на тази цел са формулирани, кратко и ясно, общо девет задачи и четири подзадачи.

Описаните в глава „Материали и методи“ експериментални и теоретични подходи са изцяло адекватни поставените цел и задачи. Методите са описани достатъчно подробно, за да бъдат възпроизведени от независим изследовател. Използван е богат арсенал от експериментални методи, които са обобщени в една много прегледна и информативна схема в края на главата. Описан е детайлно начинът, по който са конструирани моделните почвени мезокосмоси. Използвани са аналитични химични методи за определяне на остатъчните концентрации Az в почвените мезокосмоси и концентрацията на неорганични йони. Микробиологичните анализи включват ензимологични методи за измерване на активността на почвените ензими, прилагане на комерсиалната система Biolog EcoPlate за изследване на метаболитния профил на почвените бактериални съобщества и култивационни методи за определяне на антибиотична резистентност и на бактериалното и гъбно разнообразие чрез молекулярно-генетични методи. Последните включват фингерпринтинг, количествена полимеразна верижна реакция (qPCR) и конструиране на клонови библиотеки. Използван е богат набор от компютърни програми за статистическа обработка и анализ на данните от експерименталните изследвания в т. ч. статистическата програма PAST, анализ на главните компоненти (PCA), клъстерен и корелационен анализ в т. ч. каноничен корелационен анализ (CCA), непараметрично многомерно мащабиране (NMDS), пермутационен многовариантен анализ на дисперсията (PERMANOVA), разбивка на процентите на сходство (SIMPER) и др.

Всички изследвания са проведени с два вида почви, песъчлива (LS) (ливадна почва) и глинесто песъчлива (CL) (обработваема почва), които имат различен механичен състав. Съдържанието на глинести частици и органично вещество в CL почвата е значително по-голямо. Хипотезата е, че този различен състав на двете почви ще повлияе „съдбата“ на Az, а оттам неговия ефект върху почвения микробиом. С всяка от двете почви са конструирани по 4 моделни мезокосмоса – контролен и три, третиращи с нарастващи концентрации на фунгицида (Quadris®), от работната концентрация (0.28 mg/kg) до приблизително 50 и 100 по-високи концентрации, съответно 14.46 mg/kg и 28.93 mg/kg. Използването на тези високи концентрации Az е аргументирано с факта, че това позволява сравняване на новополучените с литературни данни и идентифицирането на микробни щамове с висок потенциал за биоремедиация на почвата. Анализите са извършвани на едномесечни интервали, т. е. на 1-вия, 30-тия, 60-тия, 90-тия и 120-тия ден след замърсяването на мезокосмосите с фунгицида. Най-напред са определени **остатъчните концентрации Az** в двете почви. Прави впечатление, че докато в LS почвата се наблюдава постепенен спад на Az концентрацията с времето, то двете най-високи Az концентрации в CL почва показват период на спад, следван от нарастване на концентрацията. Приведено е разумно обяснение на този факт и то е, че по-силната сорбция на Az върху почвените частици в CL почвата възпрепятства количествената му екстракция преди анализите. Данните убедително говорят за една значително (десетократно) по-висока устойчивост на фунгицида в CL почвата, с което са потвърдени литературни данни. Съгласно съществуващите класификации и на базата на собствените резултати докторантката отнася Az към групата пестициди с много висока устойчивост

(период на полуразпад над 100 дни). Тя приема схващането, че намаляването на концентрацията на Az с времето се дължи най-вече на биодegradация, особено в моделните мезокосмоси, където няма възможност за отмиване от почвата, както в природни условия. Поради тази причина са определени скоростите на биодegradация на фунгицида като е намерено, че най-ниската доза Az се разгражда най-бързо, с което отново са потвърдени литературни данни. Коментирани са въпросът дали в природни условия трябва да очакваме по-висока или по-ниска устойчивост на фунгицида. Трудно е да се предвиди точно съдбата на фунгицида в реални условия поради очаквани противоположни тенденции, но е ясно, че изключително високата му устойчивост предполага интоксикация на почвения биом и замърсяване на околната среда, особено след многократно приложение. **ВЪПРОС: Публикувани ли са в литературата данни за реалните концентрации Az в обработваеми площи след еднократно или многократно прилагане на пестицида?**

Очаква се високите остатъчни концентрации Az, особено в CL почвата, да повлияят **абиотичните фактори**, а оттам индиректно и почвения микробиом. Изследвани са рН, електропроводимост, съдържание на органичен въглерод, общ азот, неорганичен азот и фосфати в конструираните мезокосмоси. Двете изследвани почви са с кисело рН като „по-кисела“ от двете е LS почвата. Третирането на почвите с Az води до незначително намаляване на рН. Тъй като Az е по-неустойчив в алкална среда, това означава, че характерната за почвите киселинност и лекото ѝ покачване в присъствието на Az ще имат по-скоро стабилизиращ ефект върху фунгицида. За нетретираните почви измерванията показват по-висока електропроводимост и по-високо съдържание на органичен въглерод и общ азот в CL почвата, което се обяснява с по-високото съдържание на органично вещество в нея. Не са отчетени съществени ефекти от третирането с Az върху тези почвени показатели. Няма публикувани данни за ефекта на почвената електропроводимост върху микробиома, но по повод този показател е направен коментар, че стойностите му и в двете почви са значително под максималния праг, над който се регистрират негативни ефекти върху културите и добивите от тях. Не са намерени значими разлики в съдържанието на неорганични фосфати в двете нетретираните почви и третирането с Az не променя значимо този показател. За оценка на съдържанието на неорганичен азот в почвите са измервани нитратен и амониен азот като прави впечатление, че и в двете почви (третираните и нетретираните) значително преобладава нитратният азот. Третирането с Az (Фиг. 3.11) води до повишаване на нитратния азот в двете почви и като цяло до понижаване на амониения азот в CL почва и повишаването му в LS почвата в сравнение с контролите. Изброени са няколко хипотетични причини за покачване на нитратите в почвите след третиране с Az и е направен коментарът, че токсичният ефект на този агрохимикал се компенсира от свойството му да повишава съдържанието на нитрати в почвата. **ВЪПРОС: В молекулата на Az има три азотни атома. Възможно ли е биотрансформация на фунгицида в почвата да доведе до освобождаване на нитрати?** Направеният анализ на корелациите между отделните абиотични фактори води до интересното наблюдение, че при всички наблюдавани корелации в LS почвата корелационният коефициент нараства с нарастване на Az концентрацията. Направен е изводът, че Az внася съществена динамика в хранителния състав на LS почвата, откъдето би могъл индиректно да повлияе микробиома. Проведеният клъстерен анализ пък показва, че нетретираният мезокосмос от CL почвата се групира заедно с този, третиран с най-високата концентрация Az, докато същите

мезокосмоси от LS почвата попадат в различни клъстери. От това наблюдение е направен важният извод, че Az предизвиква значително по-малки промени на абиотичните фактори в CL в сравнение с LS почвата. Може да се очаква, че в обработваемата почва микробиомът ще бъде по-защитен от драстични промени в абиотичните фактори на средата след третиране на насажденията с фунгицида.

Втората част на глава „Резултати и обсъждане“ представя данни от изследване на ефекта на Az върху **функционалните характеристики** на почвения микробиом в три аспекта – почвени ензими, метаболитна активност и антибиотична резистентност. **Почвените ензими** са важен индикатор за състоянието на биома, а оттам и за почвеното плодородие. Изследвани са активностите на шест ензима - дехидрогеназа (Dha), бета-глюкозидаза (BG1), кисела фосфатаза (AcP), алкална фосфатаза (AlP), уреаза (Ur) и арилсулфатаза (ArS). За повечето от тези ензими в литературата няма данни за това как се повлияват при замърсяване на почвите с Az, което определя приносния характер на тези изследвания. Преди оценка на ефекта на Az е изследвано значението на типа почва за ензимните активности. Тези изследвания ясно показват, че в нетретираните почви повечето ензими са с по-висока активност в LS в сравнение с CL почвата, с което са потвърдени литературни данни. Влиянието на Az върху почвените ензими е представяно по два начина – като средни стойности от петте времеви точки на пробовземане и в динамика за целия период на замърсяване на почвените мезокосмоси с фунгицида. Смятам, че вторият начин е по-информативен и напълно достатъчен за графично представяне на данните. Въпреки флукутации на активностите във времето, като цяло всички ензими (без Dha) се повлияват слабо от Az в двете почви, т. е. епизодичните инхибиращи или стимулиращи ефекти на фунгицида в повечето случаи са слаби и краткотрайни. Дехидрогеназата се инхибира в LS и стимулира в CL почвата до 8-9 пъти при продължителното (120 дни) замърсяване с най-високата концентрация на фунгицида. Въпреки тези противоположни ефекти на фунгицида в двете почви, коментарът на докторантката е, че те са „дисбалансиращи“ и в двата случая. Това тя обяснява с факта, че необичайно високите активности на Dha в CL почвата биха довели до ускорено минерализиране на органичната материя, обедняване на почвата на биогенни елементи и промяна в нейните буферни свойства, което звучи логично и правдоподобно. **ЗАБЕЛЕЖКА: На фигури 3.18, 3.24, 3.27, 3.30 и 3.33 мерните единици на ординатата, съгласно описанието в Материали & Методи, трябва да са  $\mu\text{g/g}$ , а не  $\text{mg/g}$ , при това отнесени към 1 час. На фигури 3.19, 3.22, 3.23, 3.25, 3.26, 3.28, 3.29, 3.31 и 3.32 мерните единици на ординатата трябва да са „процент от контролата“ вместо  $\mu\text{g/g}$ .** За комплексна оценка на ефекта на Az върху почвените ензими получените експериментални данни са подложени на PCA и клъстерен анализ. Тези анализи ясно разграничават контролните от третираните мезокосмоси в двете почви като разликите между почвите се свеждат до това доколко разграничими са ефектите на отделните концентрации на фунгицида. Докладваните в първата част на глава „Резултати и обсъждане“ резултати показват, че Az повлиява някои от абиотичните фактори в почвените мезокосмоси и е логично да се допусне, че той може да оказва индиректен ефект върху ензимите, променяйки почвената среда. За да се оценят тези взаимовръзки е проведен ССА. Наистина, за LS почвата този анализ показва, че Dha се повлиява индиректно от промяната в рН и съдържанието на фосфати. Директен ефект на фунгицида е отчетен само при най-високите концентрации върху BG1, докато ниската (работна) доза оказва само индиректен ефект върху ензима, чрез промяна в концентрацията на амониевите йони. Най-

важният извод за CL почвата, който потвърждава предишните е, че индикаторна за контролата е ArS, която се повлиява индиректно от рН, амониеви и фосфатни йони. За тази почва няма убедителни данни за директен ефект на фунгицида върху почвените ензими, което докторантката обяснява с качествата и на органична буферна зона.

**Метаболитната активност** на бактериалните съобщества в мезокосмосите е изследвана с комерсиални микротитърни плаки BIOLOG, съдържащи 31 въглеродни източници от 5 групи - въглехидрати (CH), полимери (Polym), карбоксилни киселини (CA), аминокиселини (AA) и амини/амиди (Amin). Изследвани са параметрите средна метаболитна активност, метаболитен профил и функционално разнообразие. В незамърсените мезокосмоси средната метаболитна активност и функционалното разнообразие, изчислено чрез индекса на Макинтош, са статистически значимо по-високи в CL в сравнение с LS почвата, което е обяснено с наличието на повече органично вещество, азот и фосфор в CL почвата. В замърсените мезокосмоси средната метаболитна активност показва еднаква тенденция и в двете почви, но в динамика се наблюдават съществени различия. В LS почвата и трите тествани концентрации на фунгицида инхибират метаболитната активност до 30-тия ден, следвано от възстановяване и стимулиране до 120-тия ден. За Az това са първите публикувани данни, които потвърждават резултати, получени с други агрохимикали. Динамиката в CL почвата е доста по-различна. Приведени са адекватни, логични обяснения за наблюдаваните ефекти на фунгицида върху метаболитната активност в двете почви. Метаболитните профили на двете почви са изследвани чрез обработка на данните от BIOLOG чрез няколко компютърни програми. Проведената ординация NMDS показва, че метаболитните профили в **LS почвата** се групират в зависимост от продължителността на третиране на почвата с Az, но не и от неговата концентрация. На практика това е друга интерпретация на резултатите от Фиг. 3.44, които показват, че средната метаболитна активност в трите третирани мезокосмоса следва сходна динамика във времето. Резултатът е потвърден и чрез двумерна PERMANOVA, която в допълнение показва, че освен продължителността на третиране с Az, комбинацията от продължителност на третиране и концентрацията на фунгицида има макар и незначителен, статистически значим дял в обособяването на профилите. Допълнителна информация е получена чрез процедурата SIMPER, приложена както към петте групи въглеродни източници, така и към индивидуалните въглеродни източници във всяка група. Резултатите показват, че най-голямо значение за отдиференциране на отделните метаболитни профили имат Amin (путресцин), AA (L-серин) и CH (D-целобиоза). Проведеният корелационен анализ на взаимозависимостите в усвояването на отделните въглеродни източници дава основание на докторантката да заключи, в по-големи концентрации Az деструктурира комплексността в клетъчния метаболизъм. Задълбочено са коментирани разликите в усвояването на AA и Amin в края на периода, усвояването на CH и причините за дисбаланса в клетъчния метаболизъм. Коментарите към фигурите и интерпретацията на представените на тях резултати са точни и прецизни. Същите аналитични методи са приложени за характеристика на метаболитния профил на **CL почвата**. Разлики между двете почви са установени при SIMPER анализа, който показва, че в CL почвата Polym, а не CH са третия по значимост фактор за отдиференциране на метаболитните профили. Съществена разлика между двете почви се наблюдава в резултатите от корелационния анализ. За CL почвата с нарастване на Az концентрацията броят на значимите линейни корелации се запазва, което е индикация за по-слаб ефект на фунгицида върху комплексността на метаболизма в тази почва“.

**ВЪПРОС:** И в двете почви определяща за метаболитните профили е експозицията, но макар и по-малък, но значим ( $p=0.0001$ ) дял има и концентрацията на фунгицида. В коя почва този дял на фунгицида е по-голям? За пясъчливата почва стойността на параметъра  $F$  е 31.831 (Табл. 3.1), а за глинесто пясъчливата - 331.94 (Табл. 3.4). Това означава ли, че в глинесто пясъчливата почва дозата на фунгицида има десетократно по-висока тежест в обособяването на метаболитните профили, отколкото в пясъчливата почва? Чрез изчисляване на индексите на Макинтош и Шанон е намерено, че третирането с Az променя по различен начин функционалното разнообразие на бактериалните съобщества в двете почви. В определени периоди се променя броят на използваните източници, а в други – интензивността на тяхното усвояване. За оценка на ефекта на абиотичните фактори върху метаболитната активност и функционалното разнообразие е проведен ССА, в който като променливи са въведени абиотичните фактори, въглеродните източници, двата индекса за функционално разнообразие и средната метаболитна активност. От представените данни следва, че най-голям ефект върху средната метаболитна активност на двете почви имат киселинността и третирането с Az.

**Антибиотичната резистентност** е дефинирана като „естествена“ (в нетретираните) и „индуцирана“ (в третираните) мезокосмоси. Изследвана е резистентността към шест клинично значими антибиотици - ампицилин (Amp), тетрациклин (Tet), хлорамфеникол (Cam), гентамицин (Gen), стрептомицин (Str) и канамицин (Kan). Естествената резистентност към отделните антибиотици е сравнима и сравнително ниска, с изключение на тази към Amp, към който устойчивостта е 4 (LS почва) до 7 (CL почва) пъти по-висока, отколкото към останалите антибиотици. Като цяло в CL почвата са отчетени по-високи стойности на резистентността, най-вече към Str, Kan и Amp. Индуцираната от Az средна резистентност към четири от антибиотиците (Str, Tet, Amp и Cam) в LS почвата е около 2.5 пъти по-висока, отколкото в CL. Приложената процедура PERMANOVA разкрива, че значение (статистически значимо) за разликите в антибиотичната резистентност на бактериалните съобщества от различните мезокосмоси в LS почвата има груповата принадлежност на антибиотика, а в CL и Az концентрацията. Направен е изводът, „че бактериалните съобщества под действието на Az повишават резистентността си спрямо антибиотици, за които основен механизъм за дезактивиране при микроорганизмите е синтез на антибиотик-лизиращи ензими“ (стр. 131). Представени са данни от корелационен анализ на зависимостите между антибиотичните резистентности, Az дозата и времето на експозиция, от които са видни вида на корелациите (негативни или позитивни), тяхната степен и статистическа значимост. За оценка на устойчивостта на промените в бактериалните съобщества и влиянието на средата за индуцирането на антибиотична резистентност е приложен PCA. Основният извод (с потвърдителен характер) е, че типът почва е от решаващо значение за изява на антибиотичната резистентност на почвените бактериални съобщества, докато Az дозата е от второстепенно значение. **ЗАБЕЛЕКА/ПРЕПОРЪКА:** Според мен терминът „индуцирана“ резистентност не е точен. Третирането с азоксистробин може да селектира клонове, които са били устойчиви до третирането с фунгицида, но не и директно да индуцира устойчивост. Много често антибиотичната резистентност е резултат от мутации (спонтанни и/или индуцирани) и моята препоръка е азоксистробинът да се изследва за мутагенен ефект.

Третата част на глава „Резултати и обсъждане“ е посветена на Az ефекта върху структурата на микробните съобщества. Добро впечатление прави прилагането на различни експериментални подходи и компютърни програми за оценка на този ефект. Основните експериментални методи са фингерпринтинг, количествен PCR и конструиране на клонови библиотеки. Използваната фингерпринтинг техника ARDRA (рестрикционен анализ на амплифицирана рибозомна ДНК) е прилагана към култивируемите микроби, които макар че съставляват само 1%, са активната част в почвените съобщества, реагираща първи на промени в околната среда. При анализа на бактериалните съобщества в половината от културалните среди е добавян Az за оценка на евентуалния му селективен ефект. **ВЪПРОС: Посочено е, че култивирането на бактериите се извършва в течна среда, в която азоксисдобинът постепенно измества основния въглероден източник (глюкозата). В същото време към всички среди е добавян азоксисдобин в еднаква крайна концентрация, като не е отбелязано дали е променяна концентрацията на глюкозата. Въпросът ми е променяна ли е концентрацията на глюкозата и има ли среда, в която азоксисдобинът е единственият въглероден източник?** От LS почвата са изолирани общо 40 метагеномни ДНКи, т. е. от всички мезокосмоси със или без допълнително добавяне на Az за петте времеви точки на пробовземане. Получените резултати от ARDRA са подложени на PCA, кълстерен анализ и изчисляване на индексите за бактериално разнообразие. От PCA е направен изводът, че след 90-тия ден бактериалните съобщества в LS почвата постепенно започват да се връщат към първоначалния си профил, но не се възстановяват напълно. Кълстерният анализ не потвърждава направеното предположение за селективен ефект на Az на 30-тия, 60-тия и 90-тия ден, който да обясни промяната в ARDRA профилите в тези дни. Направено е алтернативното обяснение, че пререструктурирането на бактериалните съобщества в тези дни се дължи на загинала гъбна и бактериална биомаса и започнали процеси на биодеградация. Изчисляването на трите индекса за разнообразие, на Пилоу, Чао и Шанон, показва, че за разнообразието в отделните мезокосмоси от LS почва допринася основно броят на видовете бактерии, а не тяхната изравненост (численост). Стойностите на индекса на Шанон говорят за едно сравнително високо разнообразие, което държи да отбележа, впоследствие е потвърдено чрез независимия метод на конструиране на клонови библиотеки. Прави още впечатление, че съгласно този индекс, бактериалното разнообразие в дни 1, 30 и 60 в замърсените с Az мезокосмоси нараства в сравнение с нетретирани контроли. Макар, че не е направен подобен коментар, според мен нарасалото разнообразие от бактериални видове в тези дни след третиране, особено с най-високата Az концентрация, потвърждава направения от кълстерния анализ извод за липсата на селективен ефект на фунгицида. Логично е да се допусне, че един директен токсичен и/или селективен ефект би довел до първоначално намаляване, а не увеличаване на видовото разнообразие. Получените чрез ARDRA данни за CL почвата са по-оскъдни. Всички анализирани 16 проби показват еднакъв рестриктазен профил, поради което с данните за CL почвата не са проведени PCA и кълстерен анализ. Чрез кълстерен анализ обаче са сравнени данните за двата вида почви, от което са направени изводите, че „бактериалните съобщества, изолирани от различни типове почви, отговарят по сходен начин на третирането с азоксисдобин“ и че „азоксисдобинът не оказва съществено влияние върху структурата и биоразнообразието на почвените бактериални съобщества“.

Същият метод, ARDRA, е приложен и за определяне на биоразнообразието на почвените гъбни съобщества. За песъчливата почва са представени ARDRA профилите на



ДНК, изолирана от гъбна биомаса, култивирана от почвени проби взети на 1-вия, 30-тия и 60-тия ден от контролния мезокосмос и този, третиран с най-ниската, работна Az концентрация. Електрофоретичният ARDRA профил (Фиг. 3.75) показва, че ефектът на фунгицида е бърз, тъй като промяна в профила се наблюдава още на първия ден с работната Az концентрация. Това се потвърждава и от клъстерния анализ, който освен това показва, че продължителността на замърсяване с фунгицида също е фактор. Ефектът на времето се вижда още по-добре от анализите на биоразнообразието чрез изчисляване на съответните индекси. В третираните проби разнообразието се повишава на 30-тия ден основно чрез повишаване на броя видове гъби, но на 60-тия ден рязко се понижава и се свежда до един вид. Всички тези данни показват, че високите Az концентрации и продължителното замърсяване водят до драстично понижаване на видовото разнообразие и дори смърт на гъбните съобщества в LS почвата. Това не е неочаквано, тъй като Az е фунгицид и би могъл да има токсично действие не само върху целевите фитопатогени, но и върху други видове гъби в почвата. Изводите за CL почвата не са много по-различни. Основният извод от проведения ARDRA анализ на култивируемите микроби в мезокосмосите е, че Az повлиява трайно структурата на гъбните, но не и на бактериалните почвени съобщества. Този извод е с потвърдителен характер и се обяснява с факта, че молекулната мишена на азоксистробина е цитохром b от дихателната верига в митохондриите, които липсват в бактериите.

Структурата на микробните съобщества се определя не само от броя видове микроби, но и от числената представеност на тези видове. Терминът „обилие“ е използван нееднозначно в дисертацията, веднъж за означаване на броя видове (обилие на биоразнообразието), друг път именно в смисъла на числена представеност на видовете. Индексът на Пилоу, изчисляван от ARDRA данните, дава само индиректна представа за тази численост. Ето защо смятам за изключително удачно прилагането на qPCR за определяне на бактериалното „обилие“ в този смисъл. Чрез този метод е изчисляван броя копия на гена за 16S рДНК, който е директно и право пропорционален на бактериалното „обилие“. Важно е да се отбележи още, че като матрица в този анализ е използвана метагеномна ДНК, изолирана директно от мезокосмосите. Това според мен е най-адекватният метод за количествено определяне на бактериалните съобщества в реалните условия на мезокосмосите. Количественият PCR е проведен с проби от всички LS мезокосмоси (контролен и третиран с трите концентрации азоксистробин) в четири от времеви точки на пробовземане - ден 1-ви, 30-ти, 60-ти и 90-ти. Получените данни показват, че бактериалното „обилие“ нараства още на първия ден при високите Az концентрации, след което на ден 30-ти рязко пада под нивата на контролата и с малки флуктуации тази тенденция се запазва до последния тестиран ден (90-ти ден). Този резултат добре се съгласува с изчисления индекс на Пилоу (Фиг. 3.70Б) и показва, че в LS почвата бактериалните съобщества реагират бързо и краткотрайно на третирането с Az чрез едновременно нарастване на видовото разнообразие и на бактериалната численост, след което се възстановяват. В CL почвата е наблюдавано нарастване на бактериалното „обилие“ на 30-тия ден в сравнение с 1-вия ден, но тъй като същата тенденция е наблюдавана и в контролния, нетретиран мезокосмос е направен коректния извод „че азоксистробинът не оказва значителен ефект върху обилието на бактериалните съобщества от глинесто пясъчливата почва“. Така проведеният qPCR потвърждава направения от ARDRA извод за липса на траен ефект на Az върху почвените бактериални съобщества. В научната литература почти липсват данни от qPCR с матрица ДНК,

изолирана директно от мезокосмосите, което определя значението и приносния характер на тези изследвания. За обяснение на наблюдаваното нарастване на бактериалното „обилие“ са предложени две обяснения: а) усвояване на фунгицида като енергиен и хранителен източник и/или б) отстраняване или потискане на гъбни видове под действието на Az.

Конструирането на клонови библиотеки на базата на ДНК, изолирана директно от мезокосмосите има това предимство, че дава едновременна представа за микробното присъствие в двата аспекта – таксономично разнообразие и относителна численост на отделните таксони. Методът е приложен към бактериалните и гъбни съобщества като в първия случай е амплифициран и клониран бактериалния ген за 16S рДНК, а във втория - транскрибируемия междугенен участък (ITS) на гъбния рибозомен клъстер. Следвана е една обща работна схема. Всички получени клонове са подложени на RFLP (анализ на полиморфизма в дължината на рестриктазните фрагменти), данните от които са използвани от една страна за изчисляване на индексите за биоразнообразие, а от друга – за отнасяне на клоновете към определени филогенетични групи. Представители от отделните филотипни групи, както и индивидуалните клонове (непопадащи в нито една от групите) са секвенирани, след което са определяни филотипната принадлежност и таксономично обилие на клоновете. От двата типа почви са конструирани **10 16S рДНК клонови библиотеки**, съдържащи общо 821 бактериални клона (487 от LS почва и 334 от CL почва). Още на този етап за пореден път прави впечатление голямото таксономично разнообразие, тъй като във всички библиотеки доминират индивидуалните клонове. Изчислените индекси на Чао и Шанон показват, че докато LS почвата реагира на 1-вия и 30-тия ден след замърсяването с Az чрез увеличаване на разнообразието от видове бактерии, то CL почвата реагира точно обратното, с понижаване, което е в пълно съгласие с данните от ARDRA (виж по-горе). В двете изследвани почви бактериите принадлежат към 5 еднакви таксони (отдели) и се различават по един - Verrucomicrobia в LS и Cyanobacteria в CL почвата. За голяма част от клоновете, особено в LS почвата, се предполага че са нови некултивируеми видове поради ниския процент хомология (под 95%) с депозираните до момента данни в GenBank. Таксономичното обилие е представено на нивото на различни таксони (отдел и клас) като процент клонове от общия брой клонове в дадена библиотека. Данните на ниво отдел/клас показват, че установеното и с други методи нарастване на биоразнообразието на 1-ия ден след замърсяване на LS почвата с Az се дължи както на появата на нови отдели/класове (Bacteroidetes и Planctomycetes/Chitinophagia и Phycisphaene), така и на процентната представеност на определени отдели/класове. Продължителността на замърсяването с Az също оказва ефект. Напр. на 30-тия ден от замърсяването в LS почвата се появяват представители на отдел Firmicutes и стават доминиращи, а отпадат тези от отдел Planctomycetes. На ниво клас на 30-тия ден се появяват Bacilli и изчезва клас Phycisphaene. Анализът на таксономичното обилие в CL почвата потвърждава данните от изчислените индекси за по-голямо разнообразие в нетретираните в сравнение с третираните мезокосмоси като е видно, че то се дължи не толкова на броя таксони, колкото на процентната им представеност. Отдел Firmicutes и клас Bacilli присъстват и в CL почвата с тази разлика от LS, че те се появяват в третираните мезокосмоси още на 1-вия ден. В литературата има данни, че представители на род Bacillus участват в разграждането на пестициди, в т. ч. на Az, което добре се съгласува с представените от докторантката данни.

За оценка на биоразнообразието на гъбните почвени съобщества са конструирани **ITS клонови библиотеки**, по 4 за всяка от почвите, съдържащи общо 348 клона (186 от LS почвата и 162 от CL почвата). Отново (както при бактериите) разпределението на RFLP профилите по филотипни групи и индивидуални клонове показва доминиране на индивидуални клонове, което говори за голямо разнообразие на гъбните съобщества. Друго сходство с поведението на бактериалните съобщества показва изчисленият индекс на Чао – третирането с Az на LS почвата води до повишаване, а на CL до понижаване на микробното разнообразие. Тук прави впечатление, че в сравнение с бактериалните, по-голяма част от гъбните клонове са идентифицирани до вид. **ВЪПРОС: Какво е обяснението на този факт?** Идентифицираните видове в LS почвата са отнесени към 8 отдела, а тези в CL към 5, което говори за по-голямо таксономично разнообразие в пясъчливата почва. Тук докторантката е направила по-подробен коментар на отдел Ascomycota (родове Trichoderma, Chloridium и Penicillium), които се откриват в LS почвата на първия ден от изследването и на отдел Basidiomycota (родове Saitosyma и Solicoccozyma) от 30-тия ден след третирането. Специално за разпределението на родове Trichoderma и Penicillium получените от нея данни имат потвърдителен характер. Отдел Ascomycota е широко застъпени и в CL почвата като тук доминират родове, чиито представители са известни фитопатогени. Растителни патогени са описани и за род Rhizopus (отдел Mucromycota), открит в CL почвата. Наличието на фитопатогени добре обяснява резултатите от ARDRA, които показват негативен ефект върху гъбните съобщества след продължително третиране с Az, чиято мишена са именно фитопатогенните гъби. Анализът на таксономичното обилие на ниво отдел и подтип показва, че ефектът на Az върху гъбните съобщества зависи от типа почва. В двете почви присъстват различни отделы и подтипове, чието процентно разпределение също е различно като CL почвата се характеризира с доминиране на определени видове, а пясъчливата – с голямо разнообразие от видове, които са по-слабо представени.

В края на дисертацията са направени 10 основни извода и са формулирани 6 приноса с научен и научно-приложен характер, които вярно и точно отразяват основните резултати от проведените експерименталните и теоретични изследвания. Към тях нямам забележки и въпроси, както и към автореферата, който е оформен съгласно изискванията и в компактен обем от 52 стр. представя „есенцията“ на дисертационния труд.

По темата на дисертацията са публикувани две статии в списанието *Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences* (Доклади на БАН) с квартил Q2, което се реферира в ISI Web of Knowledge. Тези две статии отразяват само една малка част от докладваните в дисертацията резултати, отнасящи се до влиянието на азоксистеробина върху антибиотичната устойчивост на почвените бактериални съобщества. Убедена съм, че е въпрос на време останалите данни от това интересно и комплексно изследване да бъдат публикувани в други престижни международни списания. Докторантката е участвала в общо 9 научни форума, проведени в България, някои от които с международно участие като в 7 от тях тя е първи (представящ) автор. Тя е взела участие още в изпълнението на три научно-изследователски проекта по темата на дисертацията, един финансиран от НФНИ и два – от Фонд „Научни изследвания“ на СУ „Св. Климент Охридски“.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Направените от мен критични забележки ни най-малко не омаловажават значението на дисертационния труд на Михаела Алексова. Този труд заслужава висока оценка, тъй като за първи път представя едно комплексно изследване на разнообразните ефекти върху почвата и почвения микробиом на фунгицида азоксистробин, широко навлязъл в употреба през последните години, в т. ч. и у нас. Изследванията са проведени на високо научно ниво, а получените резултати са или нови за науката или допринасящи за изясняване на все още спорни въпроси за влиянието на пестицида върху абиотичните и биотични фактори на средата и за степента на заплахата от замърсяване на околната среда. Докторантката е овладяла голямо разнообразие от експериментални и теоретични методи, както и умението да представя своите изследвания пред научната общност. Дисертационният труд отговаря на всички формални изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България и на правилниците за неговото приложение, в т. ч. на вътрешния правилник на БФ на СУ „Св. Кл. Охридски“. Всичко това ми дава основание убедено да дам своя положителен вот за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“ на Михаела Руменова Алексова по професионално направление: 4.3. Биологически науки, научна специалност: Екология и опазване на екосистемите – Екология на микроорганизмите.

25.02.2020 г.

Рецензент:

/проф. Р. Миронова/