

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд, представен за защита по процедура за присъждане на образователна и научна степен “Доктор” по професионално направление 5.11. „Биотехнологии“ (Технология на биологично активните вещества)

Тема: „Изследване фитохормоналната активност на щамове от род *Pseudomonas* и конструиране на бионаноформули за подобряване продуктивността на растенията“

Автор: редовен докторант Теодора Владимирова Георгиева

Научен ръководител: доц. д-р Валентин Савов

Рецензент: доц. д-р Траяна Недева

Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски“

Настоящата рецензия е изготвена в съответствие с нормативните документи – ЗРАС и ППЗРАС и Препоръките на ФС на БФ за критериите при придобиване на научни степени, съобразени с тях.

1. Съвременно състояние на научния проблем и актуалност на дисертационната тема

Устойчивото развитие е фундаментална цел на ЕС, заложена в Договора за Европейския съюз. Стремешът към устойчиво икономическо развитие включва и насърчаване развитието на органичното земеделие като алтернатива на традиционните земеделски практики. Органичното земеделие обхваща разработването и прилагането на биоторове и стимулиращи растежа на растенията органични вещества. Поради тази причина, създаването на технологии за производство на биоторове има принос при задоволяване на нарастващите нужди от безопасни и здравословни храни от една страна и опазването на околната среда от друга. Използването на биоторове (микробни инокуланти), конструирани на основата на ризосферни бактерии представлява перспективна тенденция в органичното земеделие и благоприятна алтернатива за околната среда.

Понастоящем нанотехнологиите се очертават като шестата революционна технология, след зелената революция от 1960-те и биотехнологичната революция от 1990-те години на миналия век. Нанотехнологиите са иновативен научен подход, включващ използването на материали и оборудване, които могат да манипулират физичните и химичните свойства на дадено вещество при молекулярни нива. Потенциалните приложения и ползи от нанотехнологиите са огромни. По отношение на селското стопанство, те намират приложение за откриване на замърсители, за контролирана доставка на пестициди, хранителни вещества, дори трансфер на генетичен материал; за проследяване на патогени и болестотворни процеси.

В контекста на гореизложеното, представеният ми за рецензиране научен труд е посветен на актуална научна и научно-приложна тематика, свързана с фитохормоналната активност на ризобактериални щамове от род *Pseudomonas* и

тяхното приложение за конструиране на бионаноформули, насочени към повишаване стопанско значимите характеристики на растенията.

2. Оценка на структурата, специфичните задачи и тяхното съответствие с поставения научен проблем

Дисертационният труд е с обем 118 стр., от които основен текст 97 стр. и списък на използваните литературните източници – 15 стр. (217 заглавия), други приложения – 3 стр., (в т.ч. списък с използваните съкращения и справка за публикационна активност и проектна дейност). Работата е структурирана по общоприетия за такъв вид труд схема, като включва част „Увод“ (2 стр.), „Литературен обзор“ (29 стр.), „Цел и задачи“ (1 стр.), „Материали и методи“ (12 стр.), „Резултати и обсъждане“ (51 стр.), „Изводи и приноси“ (2 стр.). Научните доказателства са представени с графики (24 бр.), снимки (13 бр.) и таблици (16 бр.). Съотношението на текст към илюстративен материал е приблизително 1:1, което е очаквано за една експериментална работа. Представени са 10 извода, за обсъждане на резултатите са цитирани 60 автора.

Приложеният към основния труд Автореферат с обем 57 стр. основен текст е изготвен съгласно изискванията и отразява пропорционално и адекватно същността на дисертацията.

В работата е формулирана 1 цел и 8 специфични задачи, две от които с подзадачи. Задачите определят логичната последователност от изследователски решения, които започват с физиологично, биохимично и молекулярно-генетично охарактеризиране на изследваните бактериални щамове; следва проучване на RGP-активностите им, култивиране и пост-култивационна обработка; мащабиране на процесите за получаване и съхранение на биомаса, растителни тестове и проучвания, свързани с изготвянето на наноформули. Поставените задачи са достатъчни за постигане на целта на труда.

3. Оценка на съответствието на методичните подходи с поставените цели

За реализиране на научния труд е използван набор от методи, съобразени както с конкретните изисквания на експерименталните задачи, така и с интердисциплинарния подход възприет за решаването им. Разделът „Материали и методи“ включва значително разнообразие от методи и техники, типични за микробиологията, биохимията, физико-химията, молекулярната биология, растителната физиология. Това са микробиологични техники за морфологично, физиологично, биохимично и генетично охарактеризиране на изследваните щамове; аналитични биохимични методи, методи за оценка на антимикробен ефект и биологична активност към растителни обекти, култивационни техники и методи за постферментационна обработка, хроматографски и електронно микроскопски техники.

Така очертаният комплексен методичен подход (12 типа методични подходи, включващи над 30 методи и тестове) е гаранция за провеждане на задълбочено проучване за разрешаване на научните задачи и за достоверност на формулираните изводи. Освен това, възприетият от докторантката методичен подход позволява да се

проследи последователно и в детайли хода на изследователския процес. Приложените специализирани софтуерни продукти и алгоритми за статистическа обработка на получените експериментални данни канализират суровият доказателствен материал, натрупан при сериозен обем аналитична работа в достоверни резултати.

4. Оценка на съответствието на теоретичната обосновка с експерименталните решения, резултати и приноси

Увод и Литературен обзор

Уводът предоставя най-обща информация за значението на органичното земеделие в съвременната устойчива икономика, ролята на микробните инокуланти като алтернатива на химичните торове, ризобактериите като основен елемент в биологичното стимулиране на растежа на растенията и приносът на нанотехнологиите за формулиране на биоторове. Този раздел от дисертацията завършва с информация, която насочва към основните нерешени проблеми в областта и в синтетичен вид показва как разработването на дисертационния труд допринася за тяхното решаване. С други думи, представена е умело актуалността на проблема и нуждата от разрешаването му.

Литературният обзор е написан въз основа на над 200 заглавия на публикации от тематичния обхват на дисертацията. Те отразяват световните постижения и съвременни тенденции по научната проблематика – повечето от цитираните публикации са излезли от печат след 2008 година. Тези данни показват, че докторантката е приложила принципа на изчерпателност и библиографска точност, а така също се е съобразила с изискванията за актуалност на използваната информация.

По отношение на структурата на обзора: съгласно съдържанието си е структуриран в 6 части, които адекватно покриват формулираните задачи и представените резултати. Разделът е вътрешно балансиран, не само структурно, но и по съдържание. Представена е коректно доста фактология, в повечето случаи обобщена в тенденции и заключения, която въвежда читателя в същината на научната проблематика на дисертацията. Обзорът е написан интелигентно и разбираемо; излагането на научните факти е направено на професионално издържан и академичен език. Като цяло този раздел от дисертацията е добра теоретична обосновка на експериментите, резултатите и приносите.

Експериментални решения, резултати, анализи и изводи

Получените резултати са представени и интерпретирани в логическа последователност. Така и ще бъдат коментирани в рецензията.

1. Щамове продуценти. Физиолого-биохимична характеристика и молекулярно генетична идентификация на работните щамове от род *Pseudomonas*. (стр. 48 – 52)

В този подраздел са отразени коректно резултатите по таксономично определяне на моделните щамове и окончателната им видова идентификация. Разделът завършва с кратко обобщение, което в синтезиран вид показва най-важните постижения. Оценявам

положително този подход на докторантката, който тя прилага и при представяне на резултатите си и в останалите 5 части на раздела. Такова обобщение не само ориентира читателя по-лесно в големия брой експериментални данни, но и обосновава логичната връзка със следващия подраздел. Така, по убедителен и лесен за възприемане начин читателят получава представа за всичко най-значимо в дисертацията.

2. Характеристики, определящи щамовете като микроорганизми подпомагащи растежа и развитието на растенията (PGPR). Биосинтетичен потенциал на изследваните щамове. (стр. 52 – 59)

Този подраздел включва сериозна експериментална работа и значими резултати, въз основа на които 5-те щамове се класифицират като PGPR микроорганизми с потенциал за повлияване на растежа и развитието на растенията. Последователно са представени данните от скрининг процедурите за определяне на ключови биохимични характеристики на щамовете, за оценка на потенциала им за биоконтрол на тест-микробни патогени и за капацитета им да проявяват фитохормонална активност.

Комплексният подход, приложен за оценка на PGPR потенциала на изследваните щамове е най-важното достойнство на тази част от труда. Чрез този подход се стига до важното заключение, че най-ефективното решение би било прилагането на комбинация от различните изследвани щамове, като биоагенти с разнообразни ефекти върху растежа и развитието на растенията. Това е важен принос с научно-приложен характер и потенциал за налагане като добра земеделска практика.

3. и 4. Изследване на параметрите на култивиране и постферментационна обработка – лабораторна установка. (стр. 59 – 64)

Този подраздел е посветен на оценка на някои от технологичните характеристики на изследваните щамове по отношение на тяхното култивиране и изсушаване чрез лиофилизация. Реализираните тук резултати съгласно биотехнологичните параметри растеж до висока клетъчна плътност на специално аранжирани хранителни среди и подбор на оптимален режим на лиофилизация за надеждно съхранение и ревитализация на изследваните култури, показват биотехнологичния потенциал на моделните щамове. Като препоръка за бъдещи изследвания в тази насока отправям предложението да се изследва поведението на културата в динамика на по-къси интервали, което би позволило изчисляване на важни кинетични параметри с технологично значение като добив и максимален добив по биомаса, специфична и максимална специфична скорост на растеж, генерационно време, продуктивност и т.н.

Представените резултати в този подраздел са ценни с това, че очертават подбор на хранителна среда с въглероден източник глюкоза, която гарантира получаването на високо-плътностна популация от изследваните щамове. Направен е и подбор на криопротекторна среда, която пък гарантира ефективна лиофилизация, добра преживяемост и висока степен на ревитализация на микробните култури.

5. Оценка на биологичната активност на културални течности от изследваните щамове върху развитието на тест растения *in vivo*. (стр. 65 – 70)

Този подраздел е посветен на проведени *in vivo* растителни тестове за оценка на биоактивния потенциал на културални течности от изследваните щамове. Представената информация се отнася първо до моделна схема, по която са аранжирани експериментите. В експерименталната постановка се забелязва един новаторски елемент – конструиране на камера с контролирани физико-химични условия и режим на третиране на моделните растения. Следва представяне на резултатите по отношение на технически (грах) и ароматни и медицински (мента и босилек) растения.

Въз основа на растителните тестове от този подраздел, в три от изследваните щамове *Ps. putida* се установяват PGPR активности, изявен биосинтетичен потенциал и добри културални характеристики. Въз основа на тези факти, въпросните 3 щама са обект на последващото мащабиране, резултатите от което са представени в подраздел 6.

6. *Мащабиране на култивирането и пост-култивационните процеси (стр. 71 – 77)*

В този подраздел са представени резултати както от дълбочинно периодично култивиране с подхранване на един от трите, посочени в т. 5 щама, така и мащабиране на култивационния процес с трите щама и процесите на тяхното разпрашително сушене и лиофилизация. Направена е оценка на технологичните характеристики на 3-те щама както по ключови биохимични характеристики и биосинтетичен потенциал, така и по показатели, свързани със запазване на жизнеспособност и биологична активност. Получени са високоплътностни култури от трите изследвани щама, които в следствие са подложени на процеси за получаване на сухи моделни препарати със запазени жизнеспособни активни клетки. В резултат на приложената технологична схема за култивиране с натрупване на биомаса и последваща лиофилизация е формулирано технологично решение при мащабиране на процесите с цел получаване на краен продукт за приложение в биологичното земеделие.

7. *Проучване влиянието на изследваните щамове *Pseudomonas* самостоятелно и в комбинация с Хуминови субстанции върху тест растения.*

В този подраздел е проследен ефекта на сухи субстанции от трите подбрани щама върху моделното декоративно растение коледна звезда. Тези субстанции са резултат от мащабирането на процесите на разпрашително сушене и лиофилизация. Доказано е положителното влияние на хуминовите субстанции в комбинация с тестваните щамове от род *Pseudomonas* върху *Euforbia pulherrima*, като подобряващо декоративния вид на растението.

8. *Проучване и подбор на наносубстанции от въглеродни нанотръбички и наночастици от метални оксиди, и проследяване на влиянието им върху микроорганизмите. (стр. 83 – 98)*

Този подраздел обхваща интересни, новаторски резултати по отношение формулирането на бионаноконпозити, съдържащи изследваните щамове псевдомонади. Съществено значение имат резултатите по избор на процедура за подготовка на нанопробите, които акцентират върху оптимизирането на протокола за разтваряне и подготовка на нанопробите – една сериозна емпирична работа.

In vivo, *in vitro* и *in situ* оценката на потенциала на аранжираните бионаноформули е добре аргументирана и многопластова, което определя същественото ѝ практическо значение. Тя се основава на сериозна и продължителна експериментална работа, както по отношение на изготвянето на различните наноформули, така и при провеждането на растителните тестове и аналитична оценка на съдържание на основни компоненти в растителните екстракти. Тази част от дисертацията е иновативна и заслужава специално внимание по отношение на съдържание и потенциално приложение на получените резултати.

Дисертационният труд завършва с 10 извода и 5 приноса. Изводите следват хронологията на поставените задачи и представените и обсъдени експериментални резултати. Те достоверно отразяват постиженията на докторантския труд. Повечето от изводите съдържат количествени данни и така докторантката умело е елиминирала чисто констативното им звучене.

Посочените 5 приноси са с научно-приложен характер. Те отразяват адекватно новаторските елементи в дисертацията и съответстват на Професионално направление 5.11 Биотехнологии.

5. Коментари от общ характер, допълнения и въпроси

В дисертационния труд се срещат епизодични правописни и пунктуационни грешки и стилови неточности, които определено са с технически, а не същностен характер.

Въпроси:

1. Каква е връзката между регистрираните активности на литични ензими и силно изразения инхибиторен ефект на *Pseudomonas sp.* IS4 към различни гъбни тест-микроорганизми?
2. Въз основа на получените експериментални данни какъв би бил най-ефективния състав на един нов бактериален биопрепарат с RGP-активност и/или с приложение при биоконтрола в растениевъдството? Моля, коментирайте видов състав и количествени параметри.
3. Ефектите от конструираните бионаноформули върху RGP капацитета на изследваните щамове са доста разнообразни. Бихте ли коментирали по-подробно перспективите за тяхното практическо приложение?

6. Публикации във връзка с дисертационния труд

Публикационната дейност изцяло съответства на нормативните документи – ЗРАС и ППЗРАС и Препоръките ФС на БФ за критериите при придобиване на научни степени, съобразени с тях. Подробности от публикационната дейност са отразени коректно в дисертационния труд и в автореферата. Кратката статистика в цифри показва 2 публикации в реферирани научни списания с SJR 0.197, (Q3) и 0.497 (Q2); BG Journal Impact 0.3; 1 публикация в пълен текст от научен форум; 8 участия в научни форуми (5 международни и 3 национални), участие в 3 национални научни проекта; 2

цитирания. В две от публикациите и във всички постерни материали докторантката е на първо място, което определя нейният съществен дял в разработването на дисертационния труд.

7. Съответствие на придобитата компетентност с изискванията на образователната и научна степен „доктор”.

Знания:

Докторантката е усвоила нови знания в конкретна научна област: фитохормоналната активност на ризобактериални щамове от род *Pseudomonas* и тяхното приложение за конструиране на бионаноформули, насочени към повишаване стопанско значимите характеристики на растенията.

Умения:

Докторантката е придобила умения за прилагане на разнообразен методичен подход за разрешаване на конкретни изследователски задачи. Тя е усвоила микробиологични, физико-химични, биохимични, ензимологични и молекулярно-биологични методи. В допълнение на специализираните техники докторантката е придобила умения за анализ, интерпретация и оценка на експериментални данни. Тези умения са принос към съществуващите практики в професионалното направление.

Самостоятелност и отговорност:

Докторантката демонстрира самостоятелност при разработването на новаторски идеи и научни изследвания в работен контекст; независимост и поемане на отговорност при разрешаване на научни проблеми, успешно адаптиране към работна среда и екип.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Въз основа на посочените по-горе аргументи изразявам подкрепа на актуалността на проблемите, обект на дисертационната работа. По отношение на структура, специфични задачи за разрешаване на поставения научен проблем, методични подходи, експериментални решения, реализирани резултати и тяхната интерпретация, изразявам мнение, че дисертацията на докторант Теодора Георгиева е напълно завършен авторски труд, който изцяло отговаря на критериите обем, съдържание и творчество.

Във връзка с това, препоръчвам почитаемото Научно Жури, назначено със Заповед № РД 38-272 / 11.06.2019 г. на Ректора на СУ „Св. Климент Охридски“, да присъди на **Теодора Владимирова Георгиева** образователната и научна степен „доктор”.

03.09.2019 г.
София

рецензент:
(доц. д-р Траяна Недева)