



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 характеристиките и биосинтетичния потенциал на щамове от род *Bacillus* и влиянието им върху развитието на растителни видове с индустриално значение“**

Автор: редовен докторант **Веселка Йорданова 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 – Закон за развитието на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за неговото прилагане и Препоръките на Факултетния Съвет на Биологически Факултет за критериите при придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в СУ за професионално направление „Биотехнологии“, съобразени с тях.

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

Устойчивото земеделие, като част от концепцията за устойчиво развитие на глобалната икономика, е свързано с умерено и правилно използване на почвените ресурси така, че земята да запази плодородието си и за осигури на бъдещите поколения възможност за задоволяване на собствените им нужди чрез него.

Един от основните инструменти за повишаване на устойчивостта и здравето на почвата са биоторовете - препарати, съдържащи живи или латентни клетки от ефективни щамове микроорганизми, които подпомагат усвояването на хранителни вещества в културните растения чрез взаимодействието им в ризосферата, когато се прилагат чрез семена или почва. Биоторовете са евтини възобновяеми източници на хранителни вещества за растенията и използването им придобива все по-голямо значение като важен компонент на интегрираното управление на устойчивото земеделие.

Поради тези причини, през последните години се наблюдава нарастващ интерес към подбора на различни групи микроорганизми, които са включени в групата на подпомагащите растежа на растенията ризобактерии (PGPR) и тяхното прилагане като биоинокуланти под формата на гранули, микрокапсули, прахообразни и маслено-емулсионни формулировки. Сред потенциалните кандидати, представителите на род *Bacillus* са особено подходящи във връзка с доказаната им PGP активност.

Напредъкът в изучаването на физиологията, биохимията, генетиката, и молекулярната биология на представителите на род *Bacillus* предостави нови прозрения за потенциалните биотехнологични приложения на тези микроорганизми. Понастоящем са разработени техники за прилагането им например, като агенти за биоконтрол (*B. subtilis*) и биопестициди (*B. thuringiensis*). Очевидно е обаче, че климатичните промени, нарастването на световното население, ограничаването на продоволствените ресурси както и загрижеността за опазването на околната среда поставят научно-приложните изследвания на PGP капацитета на микроорганизмите на водещо място.

Във връзка с гореизложеното, проучването на биологичните характеристики и биосинтетичния потенциал на ризосферни щамове от род *Bacillus* и моделиране на тяхната PGP активност при растителни видове със стопанско значение представлява актуална научна задача с широк потенциал за практическо приложение. Именно тя е обект на настоящия дисертационен труд.

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

Дисертационният труд е с обем 151 стр., от които основен текст 109 стр., списък на използваните литературните източници – 20 стр. (285 заглавия) и други приложения – 22 стр. (в т.ч. допълнителна информация под формата на снимков материал за някои характеристики на изследваните щамове бацили и резултати от растителните тестове, списък на използваните съкращения, изводи и справка за приносите в дисертацията и публикационната активност, свързана с нея). Работата е структурирана по общоприетия за такъв вид труд схема, като включва част „Увод“ (2 стр.), „Литературен обзор“ (40 стр.), „Цел и задачи“ (2 стр.), „Материали и методи“ (14 стр.), „Резултати и обсъждане“ (50 стр.), „Изводи“ и „Приноси“ (2 стр.). Научните доказателства са представени с фигури (26 бр.), таблици (11 бр.) и снимки (над 125 бр. в основния текст и Приложения 1-6). Съотношението на текст към илюстративен материал е приблизително 1:1, което е очаквано за една експериментална работа. Представени са 8 извода и 4 обобщаващи приноса, за обсъждане на резултатите са цитирани над 120 автора.

Приложеният към основния труд Автореферат с 58 стр. основен текст е изготвен съгласно изискванията и отразява същността на дисертацията. Считаю включването към него на информацията в приложенията за неуместно.

В работата е формулирана 1 цел, 5 основни задачи и 10 специфични подзадачи. Те са предложени от схематично представяне на концепцията и експерименталния дизайн на разработката, които заедно очертават логичната последователност от изследователски решения, формулирани за реализиране на споменатата цел. Те започват с морфологично, физиолого-биохимично и молекулярно-генетично охарактеризиране на почвени изолати от бацили; следва оценка на PGP потенциала на селектирани щамове, която включва предварително определен набор от физиологични и технологични характеристики, както на микроорганизмите, така и на биотехнологичния процес за тяхното култивиране; и в последната част е представено проучване на възможностите за прилагането им като биоинокуланти на моделни растителни видове с икономическо значение.

Структурирането на експерименталната част от работата в последователност от ясно формулирани задачи и подзадачи оценявам като умение на докторантката да планира рационално и същевременно с перспектива, и да демонстрира широк поглед върху основните научни проблеми на работата си, отразени в научната хипотеза и експериментална схема.

3. Оценка на съответствието на методичните подходи с поставените цели

За реализиране на поставената цел в научния труд са използвани методи и техники, съобразени както с конкретните изисквания на експерименталните задачи, така и с цялостния подход, възприет за решаването им. Разделът „Материали и методи“ включва разнообразие от биотехнологични, микробиологични, биохимични, физикохимични, ензимологични, молекулярно-биологични техники за морфологично, физиологично, биохимично и генетично охарактеризиране на изследваните щамове; култивационни техники, аналитични биохимични и физикохимични методи, методи за оценка на ензимни активности и антимикробна активност, растителни тестове за оценка на общи биометрични показатели.

Този комплексен методичен подход (12 типа методични подходи, включващи над 40 методи и тестове) е гаранция за адекватно разрешаване на научните задачи. В допълнение, приложеният от докторантката методичен подход позволява да се проследи последователно и в детайли хода на изследователския процес и да се систематизират получените експериментални данни, продукт на сериозен обем аналитична работа, в достоверни резултати и изводи.

Разделът „Материали и методи“ е представен в подробен и добре структуриран вид. Отражава в детайли всички използвани материали, методи и апаратура; позволява повторяемост на представената методология.

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

Увод и Литературен обзор

Уводът предоставя най-обща информация за необходимостта от проучване на потенциала на представители на р. *Bacillus* като PGP инокуланти на различни стопанско значими технически и етерично-маслени растителни култури. Това всъщност е в основата на научното предизвикателство и съществуващите проблеми в областта и насочва към необходимостта от разработването на дисертационния труд за тяхното решаване.

Литературният обзор е написан въз основа на над 250 заглавия на публикации от тематичния обхват на дисертацията. Те отразяват световните постижения и съвременни тенденции по научната проблематика – повече от половината от цитираните публикации са излезли от печат след 2010 година. Тези данни показват, че докторантката се е съобразила с изискванията за актуалност на използваната информация и е приложила принципа на изчерпателност и библиографска точност.

В структурно отношение, съгласно съдържанието си обзорът е структуриран в 5 основни части, 4 от които са фокусирани върху представители на род *Bacillus*, връзката им с ризосферата, растенията и останалите микробни популации там; видове бацили, които стимулират растежа и развитието на растенията и тяхното значение за формулирането на биоторове. Коментирани са и директните и индиректните механизми за доказване на PGP активности при бактериите и по-специално при тези от р. *Bacillus*.

Разделът е вътрешно балансиран по структура и съдържание. Представени са достатъчно научни факти, в повечето случаи обобщени в тенденции и заключения. Те запознават читателя с научната проблематика на дисертацията като постижения и нерешени проблеми. Обзорът е написан разбираемо и четимо. Онагледен е с подходящ илюстративен материал; излагането на научните факти е направено на академичен език, независимо от наративната си природа. Забеляват се епизодични технически грешки, които не омаловажават същностната му ценност. 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 логическата последователност на поставените задачи и подзадачи. Те могат да се обособят в две основни направления: 1) подбор на щамове от р. *Bacillus* с PGP потенциал и неговото охарактеризиране и 2) изследване на ефекта на безклетъчна супернатанта от подобрите щамове върху развитието на технически и етерично-маслени растителни култури. Така и ще бъдат коментирани в рецензията.

1. Подбор на щамове от р. *Bacillus* с PGP потенциал и неговото охарактеризиране. (стр. 66 – 96)

В тази част от дисертационния труд са отразени резултатите по охарактеризиране на 5 новоизолирани ризосферни бактерии чрез набор от морфолого-физиологични тестове, биохимично и ензимно профилиране и молекулярно-генетичен анализ. Представени са данни за общата им микробиологична характеристика и тяхната видова идентификация чрез класически и молекулярно-генетични подходи. Таксономично, с 99% достоверност, те са отнесени към видовете *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. pumilus* и *B. thuringiensis* и са построени филогенетичните им дървета.

Експерименталната постановка и логика на този раздел, както и получените резултати относно видовата принадлежност на първоначалните изолати позволяват на докторантката да направи аргументираното заключение, че оценка на PGP потенциал, както по качествени, така и по количествени показатели е разумно да се направи на представителите и на 4-ти вида бацили. Поради тази причина всички новоидентифицирани видове са обект на следващия експериментален етап от разработката – дълбочинно култивиране на избраните щамове и изследване на основни PGP-активности.

Този подраздел от дисертационния труд е с представителен обем и фактология – реално отражение на сериозната експериментална работа. Обобщението на получените по него експериментални данни е направено в 5 от общо 8-те извода на труда. Той включва експерименти, посветени на комплексна (физиологична и технологична) оценка на PGP потенциала на 5-те моделни щамове, съобразно добре известни в науката качествени и количествени показатели. От физиологична гледна точка това са биосинтезата на литични ензими и растителни хормони от клас ауксини, способността за спорообразуване и антимикуробната активност; от технологична - конструиране на подходящи по състав хранителни среди, които индуцират желаните PGP характеристики. Аранжирани са обемни и комплексни двуфакторни експерименти, които позволяват на докторантката да направи аргументиран подбор на комбинацията моделен щам – хранителна среда.

В допълнение на този първоначален подбор е проведено оптимизиране на условията на култивиране на работните щамове. Изведен е важният извод, че развитието на културите в трите моделни хранителни среди се отличава с щамова специфичност. Това позволява гъвкав подход при аранжиране на култивационния процес и избор на съответната комбинация щам-хранителна среда според критериите ефективност на усвояване на въглеродния субстрат и акумулирана биомаса.

На пръв поглед, при представянето на информацията по отношение на ключовите PGP качества, касаеща мониторинга на физиологичните характеристики, данните за биохимичния капацитет и спорообразуването по логика би трябвало да предхождат антимикуробната активност. От друга страна, приемам решението на докторантката да акцентира върху антагонистичната активност на моделните щамове срещу бактериални

фитопатогени и антигъбните им свойства, поради тяхната важност за потенциално приложение за целите на биологичен контрол.

Като значим принос към тази част от дисертационния труд оценявам получената информация за директните и индиректните механизми, чрез които моделните бактериални щамове *B. subtilis* 6VR и 8VR, *B. cereus* 7VR, и *B. thuringiensis* 13VR упражняват своя ефект на стимулиране растежа и развитието на растенията и които ги определят като PGP микроорганизми.

2. Изследване на ефекта на на безклетъчна супернатанта от подобрите щамове върху развитието на технически и етерично-маслени растителни култури. (стр. 96 – 116)

Тази част от дисертацията е посветена на оценка на ефекта на установените PGP характеристики *in vivo* чрез провеждане на растителни тестове върху моделни технически и етерично-маслени растителни култури. Известно е, използването на биоинокуланти, съдържащи представители на ризобактериите повишава добивите на технически и етерично-маслени култури, защото те стимулират растежа на растенията чрез осъществяване на минерализация на хранителните вещества, разтваряне на фосфатите и биосинтезата на растителни хормони от класовете ауксини и гиберелини. На базата на тези факти докторантката провежда поредица от изследвания, свързани с проучване на биологичната активност на моделните бактериални щамове върху семена (къдрава салата и градински грах) и цели растения (риган) в комбинация с различни по клас и концентрация растежни регулатори. Проведена е широкообхватна експериментална работа, което се потвърждава и от факта, че растителните индекси, обект на мониторинг включват 5 основни параметъра: дължина на корена, брой разклонения на корена, брой трихоми, дължина на стеблото и брой двойки листа. Резултатите са визуализирани с над 100 представителни снимки, показани в Приложения 1-6 (в допълнение на основните диаграми), които онагледяват изведените тенденции и обобщения. От тях с приносен характер могат да се посочат следните:

- Подбор на комбинация от хранителна среда за култивиране на биоинокуланта, възраст на супернатанта и добавяне на растежни регулатори, която стимулира кълняемостта на семената и повишава броя на двойките листа в сравнение с контролни, нетретирани обекти от къдрава салата и градински грах. Предложеният режим на третиране с 120 часова безклетъчна супернатанта от изследваните щамове, култивирани и на трите хранителни среди повишава броя на двойките листа, което ги прави подходящи за приложение при отглеждането на технически култури.
- Повишаване на броя на трихомите без да се повлиява съдържанието на тимол в етеричното масло от риган при третирането на това растение.

- Повишени стойности на биометричните показатели и при трите моделни растения при третирането с изследваните щамове - предпоставка за използването им, като подобрители при отглеждането на тези растителни култури.
- Определяне на щам *B. subtilis 6VR* като потенциален компонент на препарати за биоконтрол срещу фитопатогенни филаментозни гъби от род *Fusarium*, поради високата му антагонистична активност.

5. Коментари от общ характер, допълнения и въпроси

Дисертационният труд е написан разбираемо и четимо, с демонстриран опит в детайлната и задълбочената интерпретация на получените резултати. Научните постижения са обобщени в 8 изводи и 4 приноса. Те следват логичната последователност на основните проблеми в труда и отразяват както обхвата на проведените изследвания, така и тяхната значимост във фундаментален и приложен аспект. Всъщност, приноси 2-4 биха могли да се прецизират, което би допринесло още повече за научната ценност на труда. Този коментар касае по-скоро формално разгръщане и преподреждане на направените заключения и не омаловажава тяхната научна стойност.

Въпроси:

1. С какъв състав, според Вас, би бил най-ефективният препарат за биоконтрол на фитопатогенни представители на царство *Fungi*? Аргументирайте избора си по отношение на критериите режим на прилагане и параметри за оценка на ефективност.
2. Какви перспективи за реално практическо приложение на постигнатите от Вас резултати можете да предложите?

6. Публикации във връзка с дисертационния труд

Публикационната дейност изцяло съответства на нормативните документи – ЗРАСРБ, ППЗРАСРБ 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 автореферата. Кратката статистика в цифри показва 2 публикации (1 в реферирано и индексирано издание и 1 в нереферирано и индексирано такова), 8 презентации на научни форуми (4 национални и 4 международни), участие в 2 национални научни проекта.

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

Знания:

Докторантката е усвоила нови знания в конкретна научна област: биологични характеристики и биосинтетичен потенциал на ризосферни щамове от род *Bacillus* и моделиране на тяхната PGP активност при растителни видове със стопанско значение.

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 и методология в областта на растителната физиология. 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 висока работоспособност и мотивираност, самостоятелност при разработването на новаторски идеи и последователност при провеждането на 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 Веселка 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 38-375 / 11.07.2022 г. на Ректора на СУ „Св. Климент Охридски“, да присъди на **Веселка Йорданова Георгиева** образователната и научна степен „доктор“.

14.09.2022 г.

София

рецензент:

(доц. д-р Траяна Недева)