

# РЕЦЕНЗИЯ

**от:** доц. д-р Михаил Илиев (Катедра Обща и Промислена микробиология, Биологически факултет, СУ), член на Научното жури съгласно заповед № РД 38-473/24.07.2024 г. на Ректора на СУ “Св. Климент Охридски”.

**Относно дисертационен труд** на тема: “Физиологична и биохимична характеристика на растително – микробната симбиоза на представители от род *Pseudomonas*”.

**за получаване на образователна и научна степен „ДОКТОР”** в професионално направление 4.3. “Биологични науки” (Микробиология) на докторанта Глория Бисерова Георгиева с научен ръководител доц. д-р Траяна Недева, Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски”.

**Декларирам**, че нямам конфликт на интереси по смисъла на чл. 4, ал. 5 от Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ). 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.

## **I. Оценка на структурата и оформлението на дисертационния труд**

Рецензията от мен дисертационен труд е структуриран съгласно изискванията за такъв тип научни разработки. Написан е на 217 А4 страници и съдържа следните основни раздели: 1. Въведение (1 стр.); 2. Литературен обзор (41 стр.); 3. Работна хипотеза (3 стр.); 4. Цел и задачи (2 стр.); 5. Материали и методи (21 стр.); 6. Резултати и обсъждане (74 стр.); 7. Изводи (4 стр.); 8. Приноси (2 стр.). Използваната литература обхваща 343 заглавия. Приложена е информация, свързана с публикации и участия на докторантката на научни форуми и забелязани цитирания. Много добро впечатление прави отличното техническо оформление на работата.

## **II. Актуалност и значимост на дисертационната тема**

Темата „Физиологична и биохимична характеристика на растително-микробната симбиоза на представители от рода *Pseudomonas*“ е изключително подходяща и актуална, тъй като поставя научен фокус върху сложните взаимодействия между растенията и специфични микроорганизми, по-специално бактериите от рода *Pseudomonas*. Тези взаимодействия са от решаващо значение за поддържането на

екологичния баланс в природата и имат съществен ефект в различни области, включително селското стопанство, околната среда и устойчивото земеделие. Изследването на физиологичните и биохимичните аспекти на тези взаимоотношения може да доведе до по-добро разбиране на механизмите, лежащи в основата на взаимодействията растение-микроб, и потенциално да идентифицира нови цели за подобряване на продуктивността на културите и устойчивостта към стресови фактори на околната среда. Освен това, разбирането на ролята на микроорганизмите от род *Pseudomonas* при биоконтрола може да помогне за разработването на ефективни и екологични алтернативи на химическите пестициди. Дисертацията, която изследва тази тема, несъмнено ще допринесе за нашето разбиране за тези сложни взаимоотношения и ще проправи пътя за иновативни решения за глобални предизвикателства. В контекста на несъмнените проблеми свързани с нарастването на човешкото население и бързите темпове на индустриализация, такъв тип научни разработки категорично аргументират значението на растително-микробните симбиотични системи, особено тези, включващи бактерии, стимулиращи растежа и развитието на растенията, като потенциално решение на тези проблеми.

### **III. Литературен обзор**

Литературния обзор е структуриран изключително удачно. Адекватно в началото е поставена т. 1. *”Ролята на микроорганизмите в почвата – ризосферни микроорганизми, стимулиращи растежа на растенията”*. Тази точка служи като основа за следващите раздели на литературния обзор, които се задълбочават в специфичните роли на бактериите, стимулиращи растежа и развитието на растенията, и техните потенциални приложения в устойчиви земеделски практики. В исторически аспект подобен микробиологичен фокус през годините е изменил тотално човешкото възприятие относно самата почва. От архаичната дефиниция на Kraut (1853) и Raman (1912) – “почвата е най-горният, покриващ слой на земната кора” до новаторската идея на Докучаев “Почвата не е мъртво тяло (само геологичен продукт), а е специфичен жив организъм, който се заражда и развива по свои закони.”, променящата концепция е именно почвената микробиологична компонента. Акцентът е поставен върху микроорганизмите, стимулиращи растежа на растенията (Plant Growth-Promoting Microorganisms, PGPM). Несъмнената полза от тяхното изучаване е че, PGPM могат да помогнат за намаляване на зависимостта от химически торове и пестициди, което води до по-устойчиви земеделски практики. Коректно са дефинирани и представени

понятията “Ризосфера” и “Ризобиом”. Считаю за удачно включването на редица примери, подчертаващи връзката растение-асоциирани микроорганизми.

В тази част препоръчвам включването и обсъждането на следните публикации: 1. Jones, C. S., & Wilson, D. R. (2012). Rhizosphere Bacteria: Their Role in Plant Growth and Development and Potential Benefits for Sustainable Agriculture. In *Plant Growth Promotion and Biocontrol Agents* (pp. 1-26). CRC Press. 2. Jones, C. S., & Wilson, D. R. (2012). Rhizosphere bacteria: Their contribution to nitrogen cycling and potential benefits for sustainable agriculture. In *Plant Growth Promotion and Biocontrol Agents* (pp. 27-46). CRC Press. Могат да бъдат представени и новите концепции, а именно “*Natural Intelligence Farming*”, “*The Nitrogen Solution*” и “*Fungal Energy Chanel*”, които ще допринесат за оценката на изключително комплексния характер на протичащите в ризосферата процеси, които са микробно медиирани.

В следващите части на раздела коректно и детайлно акцентът е поставен върху целевия таксон на изследването, а именно представителите на род *Pseudomonas* и познанието за тяхното участие в комплексния характер на симбионтните взаимоотношения в почвата.

Информацията е поднесена коректно и логично.

Единствената ми забележка тук, касае категоричното твърдение “С най-голямото разнообразие на планетата Земя се характеризират микроорганизмите, представени от  $10^{12}$  вида (Loosey & Lennon, 2016).” (стр. 13). В цитираната статия, посочената стойност е в резултат на допускане, базирано на мащабиране и математическо моделиране. Познатият и описан диверситет е значително по-нисък.

#### **IV. Работна хипотеза**

Считаю формулирането на Работна Хипотеза за изключително удачно и илюстративно по отношение експерименталната схема и очаквани резултати. Като цяло работната хипотеза предлага систематичен подход за изследване на PGP потенциала на бактериите от род *Pseudomonas*, който съчетава лабораторни и полеви изследвания. Ако се реализира успешно, това може да доведе до откриването на нови, полезни бактериални щамове и да подобри нашето разбиране за ролята на микроорганизмите при насърчаването на растежа на растенията и поддържането на екологичната стабилност.

#### **V. Цел и задачи**

В своята цялост целите и поставените задачи в дисертационния труд са добре структурирани и последователни, осигурявайки цялостен подход за изследване на PGP потенциала на бактериите от род *Pseudomonas* и тяхното приложение в селското стопанство и градинарството.

## **VI. Материали и методи**

Подробно и коректно е представен целия арсенал от методология, ангажирана в комплексно изследване от такъв мащаб. Обемът съответства на поставените задачи и е атестат за тяхната достоверност.

## **VII. Резултати и обсъждане**

Изследванията логично започват с детайлно описание на работните щамове, включващо анализ на асимилационните им характеристики.

1. Установяването, че нито един от щамове не редуцира нитратите до нитрити, е положително откритие, тъй като нитритите могат да бъдат токсични за растенията при високи концентрации. Наличието на нитрит-редуцираща активност в три от петте щамове е желателно, тъй като помага за предотвратяване на токсичността на нитратите и подобрява усвояването на азот от растенията. Въпреки това е важно да се отбележи, че докато наличието на нитрит редуктаза е желателна характеристика за PGP бактериите, тя не е единственият фактор, който определя ефективността на тези бактерии за подобряване на растежа на растенията.

2. Липсата на продуциране на индол и глюкозна ферментация в изследваните щамове не е непременно отрицателна черта, тъй като тези характеристики не са универсално присъстващи във всички PGP бактерии. Положителният тест за L-аргинин дехидролаза в щамове G-52 и 1046 показва, че тези щамове могат да разграждат L-аргинин, който е важен източник на азот за растенията. Тази способност е желателна характеристика за PGP бактериите, тъй като подпомага растежа на растенията чрез осигуряване на достъп до допълнителни източници на азот.

3. Липсата на активност на уреазата в изследваните щамове е положително откритие, тъй като уреазната активност може да доведе до загуба на азот под формата на амоняк, който може да бъде токсичен за растенията. Уреазата е ензим, който катализира хидролизата на урея до амоняк и въглероден диоксид. Въпреки че този процес може да бъде от полза

за някои растения чрез увеличаване на наличността на азот, той може също да бъде вреден, ако се извърши прекомерно или ако освобождава токсични нива на амоняк. В контекста на PGP бактериите, способността да се разгражда урея може да бъде както полезна, така и вредна. От една страна, разграждането на уреята може да осигури допълнителен източник на азот за растенията. От друга страна, прекомерното разграждане на уреята може да доведе до освобождаване на токсични нива на амоняк, което може да попречи на растежа на растенията и да наруши баланса на хранителните вещества в почвата.

4. Хидролизата на ескулин чрез  $\beta$ -глюкозидаза е интересна характеристика, демонстрирана от щам 1S4.

5. Установеният ензимен профил показва, че и петте изследвани щама притежават потенциала да разграждат широк спектър от органични съединения, което може да бъде от полза за растенията гостоприемници и цялостното здраве на почвата.

6. CAS анализът показва, че всички щамове произвеждат сидерофори, като щам 1S4 показва най-добър капацитет за това.

7. Наличието на протеази в четири от изследваните щамове може да бъде от полза за растенията гостоприемници чрез разграждане на протеини в растителния материал и подобряване на тяхната наличност за усвояване.

8. Четирите щама, които демонстрират ясно изразена каталазна активност (R6, Or5, 1046 и G-52), биха могли потенциално да допринесат за растежа на растенията чрез защита срещу оксидативен стрес.

9. Хроматографският анализ показва, че и петте щама произвеждат по-голямата част от изследваните регулатори на растежа на растенията, като основната разлика е количествена. Тази констатация предполага, че тези щамове могат да допринесат за растежа на растенията и тяхната защита чрез производство на PRRs, въпреки че специфичният ефект може да варира в зависимост от нивото на производство на всеки щам. Тази характеристика, заедно с други потенциални PGP характеристики, може да направи тези щамове ефективни агенти за подобряване на растежа на растенията.

С оглед на гореизложеното, напълно приемам за основателен избора на два от щамовете, а именно *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 и *Pseudomonas yamanorum* 1046 за целеви в следващите етапи от заложената експериментална схема.

Последващата оптимизация на процеса на тяхното култивиране, е извършена адекватно и логично. Работната схема на процеса на периодично култивиране с оптимизиране спрямо източниците на въглерод, азот и фосфор демонстрира ефективността на стъпаловидния подход при идентифицирането на оптималните работни концентрации на тези източници на хранителни вещества за избраните щамове. Параметърът оптична плътност, наблюдаван в този експеримент, предоставя допълнителна информация за растежа и метаболизма на бактериалните щамове при различни условия на култивиране. Тенденцията, регистрирана при екзоклетъчния протеин, показва, че най-ниските стойности на оптична плътност са при вариантите с  $\frac{1}{2}C$  и  $\frac{1}{2}P$ , което показва, че намаляването на концентрациите на въглерод и фосфор може да доведе до забавяне на растежа и метаболизма на бактериалните клетки. Резултатите от експеримента показват, че най-добрите резултати за всички параметри са постигнати във вариантите с двойни концентрации на трите източника на хранителни вещества (въглерод, азот и фосфор). Това предполага, че увеличаването на концентрациите на тези източници на хранителни вещества може значително да подобри растежа и метаболизма на бактериалните щамове, което води до подобро производство на желаните продукти. Въпреки това, икономическата осъществимост на прилагането на тези варианти в индустриален мащаб е сериозен проблем. Вариантът с така наречената базова концентрация (V) показва добри резултати, което предполага, че увеличаването на концентрациите на източниците на хранителни вещества може да не е необходимо за постигане на желаното представяне. данните от този експеримент показват, че периодът на култивиране от 168 часа води до жизнеспособни култури със силен потенциал за биосинтеза на желаните продукти по време на стационарната фаза на растеж. Избраните щамове са адаптивни към условията на култивиране и могат да поддържат стабилно производство на желаните продукти през периода на култивиране. Тези резултати могат да бъдат използвани за по-нататъшно оптимизиране на процеса на култивиране и разработване на ефективни стратегии за производство на желаните продукти.

Коректно са проведени и логично интерпретирани резултатите, свързани с продукцията на феназин-1-карбоксилна киселина и сидерофори от целевите щамове, както и техния антифунгиален капацитет.

Обобщение на тази част от експерименталната схема - оптимизацията на процеса на култивиране, биосинтезата на желаните продукти и запазването на стабилността на продуктите от *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 и *Pseudomonas yamanorum* 1046 демонстрира потенциала на тези щамове като продуценти на полезни съединения и потенциални агенти за растителна защита.

Така установения профил на избраните щамове позволява и осъществяването на следващата основна част от експерименталната схема, а именно определяне на PGP-потенциал на *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 и *Pseudomonas yamanorum* 1046: растително-микробна симбиоза с технически култури и декоративни растения.

Проучването на растително-микробната симбиоза на *Ps. chlororaphis* 1S4 и *Ps. yamanorum* 1046 с моделни растителни системи от технически култури и декоративни растения в различни фази на вегетационния период демонстрира широкия спектър от потенциални ползи от тези щамове за растенията.

Установено е, че *Ps. chlororaphis* 1S4 и *Ps. yamanorum* 1046 подобряват ефективността на прорастване на семената от техническите култури царевица, соя и пшеница, както е оценено чрез биометричните показатели на кореновата система на моделните растения. Това предполага, че тези щамове могат да се използват като биоторове за подобряване на растежа и развитието на културните растения.

Изключително адмиравам категоричния снимков доказателствен материал и графично/табличното представяне на резултатите от тази част.

Проведените експерименти и получените резултати подчертават потенциала на щамовете *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 и *Pseudomonas yamanorum* 1046 като биопестициди, агенти за биоконтрол и биоторове. Оптимизирането на условията за култивиране, биосинтезата на желаните продукти и запазването на стабилността на биологично активните фрагментационни продукти от тези щамове демонстрира тяхната гъвкавост и потенциал за практическо приложение в устойчивото земеделие. Разбирането на регулаторните механизми, контролиращи производството на тези съединения, може да помогне за разработването на стратегии за подобряване на ефективността на тези съединения като биопестициди или агенти за растителна защита.

## **VIII. Изводи и Приноси**

На базата на проведените експерименти са формулирани 9 извода. Те са логично следствие от проведената експериментална работа, напълно отразяват получените резултати и дават ясен, коректен и точен отговор на заявените цел и задачи на научната разработка. Посочени са и 5 приноса, чиято формулировка считам за коректна и отразяваща напълно приложния потенциал на научната разработка.

## **IX. Участие на докторанта в изработването на дисертацията**

Докторантката е разработила дисертацията в катедра “Обща и промишлена микробиология“ , СУ и изследователския отдел на ангажирано с тематиката производствено звено. Участието ѝ в различни научни форуми и докладване на резултати от дисертацията ми дават основание да считам, че изпълнението на дисертационния труд е напълно нейно дело.

- **Публикации и участия в научни прояви**

Докторантката е представила списък от 3 публикации по темата (две публикации в списания с Q4; една публикация в списание с Q3) в които е първи автор. Реализирани са 4 участия на научни форуми.

- **Автореферат**

Авторефератът съдържа 58 страници и отразява достоверно най-съществените резултати, получени при разработката на дисертационния труд. Структуриран е много добре, съдържа обобщени данни и научна интерпретация на получените резултати. Изводите и приносите са непроменени. Считам, че авторефератът отговаря на всички необходими изисквания.

## **X. Административни документи**

Отговарят на изискванията.

## **XI. Въпроси**

Към докторантката имам следния въпрос: Можете ли да коментирате потенциалните предизвикателства и ограничения, свързани с практическото приложение на тези щамове като биопестициди или агенти за биоконтрол, и как те могат да бъдат преодолени?

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**



Представеният дисертационен труд по обем, форма и съдържание изпълнява напълно изискванията на ЗРАСРБ, Правилника за прилагането му и Правилника на СУ „Климент Охридски“. Той е едно завършено изследване, което предоставя ценна научна информация. Темата е актуална, изследванията са проведени методично правилно, усвоен е широк набор от съвременни методи, извършена е сериозна по обем и мащаб изследователска дейност, показано е умение за тълкуване на получените резултати и извеждане на изводи и приноси. Дисертационният труд е оригинален, с научни и приложни приноси и е дело на автора.

**Изложеното по-горе ми дава основание да считам, че дисертационния труд е на високо научно ниво, придобити са компетенции в съответствие с изискванията и убедено ще гласувам за присъждане на образователната и научна степен „доктор“ на Глория Бисерова Георгиева.**

Рецензент:

/доц. д-р Михаил Илиев/

Дата: 21.09. 2024