

## РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд, представен за защита по процедура за присъждане на образователна и научна степен „доктор“ по професионално направление 4.3. Биологически науки (Микробиология)

**Тема: „Физиологична и биохимична характеристика на растително-микробната симбиоза на представители от род *Pseudomonas*“**

Автор: редовен докторант **Глория Бисерова Георгиева**

Научен ръководител: **доц. д-р Траяна Недева**

Научен консултант: **проф. д-р Петя Христова**

Рецензент: **проф. д-р Светлана Браткова**

Катедра „Инженерна геоекология“

Минно-геоложки университет „Св. Иван Рилски“

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 „Биологически науки”, съобразени с тях.

### **1. Общо представяне на материалите.**

Представеният комплект материали включва следните документи:

- автобиография;
- дипломи за висше образование (бакалавърска и магистърска степен) и приложенията към тях;
- заповед за зачисляване в редовна докторантура;
- удостоверение за проведените и издържани изпити от индивидуалния план;
- дисертационен труд;
- автореферат на български и английски език;
- списък на научните публикации по темата на дисертацията;
- копия на научните публикации по темата на дисертацията;
- списък на участията в научни форуми;
- протокол и становище от проверката за плагиатство;
- справка за съответствие с минималните изисквания за ОНС „доктор“;
- други документи, свързани с хода на процедурата.

## **2. Кратки биографични данни за докторанта.**

През 2019 г. Глория Георгиева завършва специалност „Биотехнологии“, ОКС „бакалавър“ в Биологическия факултет (БФ) на СУ „Св. Климент Охридски“, а през 2021 г. завършва магистърска програма по „Индустриални биотехнологии“ към катедра „Биотехнология“ на Биологическия факултет на СУ „Св. Климент Охридски“. В периода 2021–2024 г. е редовен докторант към катедра „Обща и промишлена микробиология“, БФ на СУ с научен ръководител доц. д-р Траяна Недева и научен консултант проф. д-р Петя Христова, през което време изпълнява задачите на дисертационен труд на тема „Физиологична и биохимична характеристика на растително-микробната симбиоза на представители от род *Pseudomonas*“. От март 2024 г. е хоноруван преподавател към катедра „Обща и промишлена микробиология“.

## **3. Съвременно състояние на научния проблем и актуалност на дисертационната тема.**

Взаимодействието на растенията със симбионтни и полезни ризосферни микроорганизми играе важна роля в развитието им. Отдавна е известна ролята на ризосферните бактерии в храненето на растенията, устойчивостта им към коренови патогени и абиотични стресови фактори. Ризосферните микроорганизми стимулират растежа на растенията чрез редица директни и индиректни механизми – азотфиксация на атмосферния азот, трансформиране на труднорастворими съединения на фосфора в лесноусвоими за растенията, посредством бактериални фосфатази, повишаване на асимилирането на нитрати, продуциране на сидерофори, хелатиращи желязото в биологично усвоима форма от растенията, синтез на физиологично активни вещества, изменение на пропускливостта на клетъчната мембрана на корените, защита срещу стресови фактори на средата, фитопатогени и др.

В световен мащаб изследванията върху ризосферната микрофлора бележат значителен ръст. Редица автори установяват високия потенциал на представители от род *Pseudomonas* да подобряват минералното хранене на растенията чрез продукция на фитохормони, органични киселини и ензими. Представителите от различни видове, принадлежащи към род *Pseudomonas*, са известни като микроорганизми, стимулиращи растежа на растенията (Plant Growth-Promoting Microorganisms, PGPM). Бактериите, принадлежащи към род *Pseudomonas*, притежават потенциал за приложение в редица биотехнологични производства, биоремедиацията и биологичния контрол. Затова намирам тематиката на представения ми за рецензиране дисертационен труд за изключително актуална и с голямо практическо значение, предвид икономическата значимост на алтернативата за целенасочено моделиране на ризосферния хабитат в търсенето на екологично издържани решения за устойчиви земеделски практики.

#### 4. Познаване на проблема.

Обзорът на дисертационния труд е задълбочен и детайлно разглежда отделните аспекти на растително-микробните взаимоотношения. Той обхваща 45 страници и съдържа 6 фигури. Подробно е разгледана ролята на микроорганизмите в ризосферата, филосферата и механизмите на действие на ризосферните микроорганизми, стимулиращи растежа на растенията. Особено внимание е обърнато на два представителя от род *Pseudomonas* – *Pseudomonas chlororaphis* и *Pseudomonas yamanorum*. Детайлно са разгледани метаболитните пътища на синтез на феназинови пигменти, техния широк спектър на антибиотична активност и роля във вирулентността. Представена е информация за продукцията на сидерофори, техния потенциал за биоконтрол на фитопатогенни микроорганизми и ролята им в подобряване на развитието на растенията чрез ефективно усвояване на желязото. Задълбочено е разгледана растително-микробната симбиоза, механизмите на комуникация между растение – микроорганизъм и участието на фитохормоните в цялостното развитие на растението. Отделни дялове са посветени на растителния имуноен отговор спрямо биотичен и абиотичен стрес и ролята на микроорганизмите в него, както и на приложението на бактерии, стимулиращи растежа на растенията като биологични агенти за контрол в конвенционалното земеделие. В дисертацията са цитирани общо 347 литературни източника, от които 343 на английски език и 4 на български език, като 70 от тях са от последните 5 години. Намирам, че докторантката е направила обширна литературна справка по тематиката на дисертационния труд. Цитираните публикации засягат всички аспекти на неговата тематика, целта и задачите, използваните методи, а освен това са използвани адекватно и при обосноваването на обсъжданите резултати.

#### 5. Цел и задачи.

Целта на дисертационния труд е кратко и ясно формулирана – подбор и изследване на бактериални щамове, принадлежащи към род *Pseudomonas*, за изучаване на феномена растително-микробна симбиоза и доказване на PGP-потенциала им. От нея произтичат осем формулирани задачи, логично групирани в три групи, които са във връзка с(ъс): а) скрининг на изолати от род *Pseudomonas* за наличие на PGP-потенциал въз основа на комплексно биохимично охарактеризиране и анализ на ключови PGP-характеристики, б) доказване на PGP-потенциала на избраните щамове чрез оптимизиране на процеса на култивиране по отношение на C, N и P източник, индукция на биосинтезата на индол-оцетна киселина, изследване на продукцията на феназин-1-карбоксилна киселина и сидерофори, оценка на изследваните щамове като агенти за биоконтрол и оптимизиране на запазването и стабилността на биологично активните ферментационни продукти на избраните щамове при лиофилизация и разпрашвателно сушене и в) изучаване

на растително-микробната симбиоза на подобраните щамове с моделни растителни системи от зърнено-житни/зърнено-бобови култури и декоративни растения в различни фази на вегетационен период.

## **6. Методика на изследването.**

В дисертационния труд е използван широк набор от методики, необходими за постигане на поставените задачи. Предоставено е пълно описание на хранителни среди за поддържане на щамовете и определяне на техните биохимични характеристики, стандартните и модифицирани хранителни среди за провеждане на периодично дълбочинно култивиране, протоколите за култивиране в колби и в биореактори. Подробно са описани методите за проследяване на динамиката на растеж на бактериалните култури, количественото определяне на разтворим белтък и остатъчните захари, определяне на ключови ензимни характеристики чрез стандартни методи и системата ApiZYM и на асимилационните характеристики чрез системата API 20 NE. Количественото определяне на продуцираните фитохормони е извършено чрез HPLC анализ. Генетичната идентификация е осъществена на база пълно секвениране на 16S rRNA от фирма Macrogen. Физиологичното въздействие на подобрани щамове от род *Pseudomonas* върху семена е изследвано чрез прорастване в рулони и агар, и върху оранжерийни растения посредством съдови експерименти.

## **7. Резултати и обсъждане.**

Това е основният раздел на дисертационния труд, който обхваща 86 страници. Представените резултати следват напълно логично поставената цел и формулираните задачи и подзадачи, като са отлично илюстрирани с 57 фигури (графики и снимков материал) и 9 таблици.

### **1. Скрининг на изолати от род *Pseudomonas* за наличие на потенциал за насърчаване на растежа на растенията (PGP)**

Оценката на PGP-потенциала на пет щамове от род *Pseudomonas* е изготвена въз основа на тяхната широкоспектърна биохимична характеристика. В резултат на биохимичното и генетично охарактеризиране и доказаните PGP-характеристики, за по-нататъшни анализи са избрани два щамове – *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 и *Pseudomonas yamanorum* 1046. Подборът на двата щамове е осъществен на база комплексна оценка на биохимичните им показатели, в това число ключови ензимни активности и по-специално на фитохормоналния им профил, съгласно който двата представителя се подреждат на първо място по разнообразие и количество на продуцираните фитохормони.

## 2. Доказване на PGP-потенциал на *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 и *Pseudomonas yamanorum* 1046

В този раздел са представени резултати от оптимизацията на култивационния процес чрез многофакторен експеримент за тестване на двукратно по-високи и по-ниски концентрации на източниците на въглерод, азот и фосфор, като са подбрани оптимални съотношения на биогенните елементи за култивиране на двата щамове. Ефективността на подбора е потвърдена при мащабиране на култивирането в 5 L биореактор. Предложен и реализиран е подход за оптимизиране на биосинтезата на индол-оцетна киселина, основан на последователно увеличаване на концентрациите на индуктора – синтетичен триптофан или триптофан с микробен произход от 0,01 % до 0,04 %. Установено е, че индуцирането на производството на ИОК с триптофан от микробен произход е 34 % по-ефективно в сравнение със синтетичния вариант. Оптимизирана е продукцията на феназин-1-карбоксилна киселина и сидерофори от хидроксиматен тип, като са специфицирани най-подходящите режими на култивиране за щамове-продуценти. Доказан е антагонистичният ефект на *Ps. chlororaphis* 1S4 и *Ps. yamanorum* 1046 срещу икономически значими патогени от род *Fusarium* чрез *in vitro* проучване на антигъбната им активност. Оптимизирани са условията за запазване на стабилността на биологично активните ферментационни продукти от *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 и *Pseudomonas yamanorum* 1046 чрез подбор на режими на лиофилизация и разпрашительно сушене.

## 3. PGP-потенциал на *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 и *Pseudomonas yamanorum* 1046: растително-микробна симбиоза със зърнено-житни/зърнено-бобови култури и декоративни растения

Проучена е растително-микробната симбиоза на *Ps. chlororaphis* 1S4 и *Ps. yamanorum* 1046 с моделни растителни системи от зърнено-житни/зърнено-бобови култури и декоративни растения в различни фази на вегетационен период. Установена е повишена ефективност на прорастване на семена на царевица, соя и пшеница, оценена по биометричните показатели на кореновата система на моделните растения. Проучена е растително-микробната симбиоза на *Ps. chlororaphis* 1S4 и *Ps. yamanorum* 1046 чрез използването на декоративните растения иглика, хризантема и циклама. Доказан е положителният ефект на свежи и изсушени култури от *Ps. chlororaphis* 1S4 и *Ps. yamanorum* 1046 (поединично и в комбинация), прилагани върху различни вегетативни части на растенията чрез различни подходи (поливане и листно пръскане). Разработена е прототипна серия от ефективни препарати с потенциал за прилагане като биотор и агенти за биоконтрол.

## 8. Изводи и приноси.

Осемте извода много добре обобщават получените данни. Изводите и приносите са формулирани достатъчно ясно. Те отговарят на обхвата на проведените изследвания и на тяхната значимост в научно-приложен аспект.

- Оригинален е използваният методически подход, включващ комплекс от биохимични характеристики за селекция на щамове с потенциал за практическото им прилагане в земеделската практика.
- Друг оригинален принос е предложеният икономически рентабилен подход за замяна на индуктор синтетичен L-триптофан с триптофан с микробен произход за стимулиране на продукцията на важния растителен хормон индол-оцетна киселина.
- Оригинален е и доказаният инхибиторен ефект на щамове *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 и *Pseudomonas yamanorum* 1046 по отношение на микопатогенни видове, принадлежащи към р. *Fusarium*, което е предпоставка за използването им като компоненти на препарати за биологичен контрол.
- Друг важен принос с приложен характер е конструираната прототипна серия от свежи и сухи култури от селектираните щамове от р. *Pseudomonas* като екологично целесъобразна алтернатива на конвенционалните торове.
- Оригинална е разработената схема за оценка на растително-микробната симбиоза между бактериални представители и моделни растителни системи чрез предложените индикатори за проследяване на процеса по отношение на микробния компонент, растителния компонент и технологията на прилагане.

## **9. Преценка на публикациите по дисертационния труд.**

Основните резултати от дисертационния труд са представени в 3 научни публикации – една публикувана в *BioRisk* и две приети за печат в *Acta Microbiologica Bulgarica*. Трите статии са на английски език, като Глория Георгиева е първи автор. Докторантката е участвала с постери и в три научни форума, като с четвърти постер предстои участие в международния научен форум INTERNATIONAL SEMINAR OF ECOLOGY- 2024 в България. Забелязани са две цитирания на публикуваната статия в *BioRisk* през 2023 г. – едното в публикация в списание с импакт фактор, а другото в дипломна работа на магистрант.

## **10. Автореферат.**

Авторефератът е написан на 58 страници, като точно са отразени основните теми, резултати и достижения на докторантския труд. Представени и обсъдени са най-важните резултати. Авторефератът завършва с 8-те извода, приносите с оригинален и потвърди-

телен характер, списък с 3-те публикации по темата на дисертацията и участията в научни форуми. Авторефератът съдържа най-важните фигури и резултати и напълно отговаря на утвърдените изисквания и стандарти.

#### **11. Лично участие на докторантката.**

Не познавам Глория Георгиева. Моята оценка за личното участие на докторантката в проведените изследвания се базира изцяло върху предоставените ми материали – дисертационен труд, автореферат, публикации и участия в научни форуми. Глория Георгиева е първи автор в публикациите по дисертацията, от което може да се направи изводът, че експерименталната работа, както и дейностите по обработката и представянето на получените резултати са в значителна степен нейна заслуга.

#### **12. Критични забележки и препоръки.**

Нямам критични забележки или препоръки към начина на провеждане на изследванията, тяхното интерпретиране или към комплекта материали, предоставени ми във връзка с придобиването на ОНС „доктор“. В дисертационния труд могат да се направят някои корекции:

На две графики (фигури 10 и 11) липсват дименсиите на абсцисата и ординатата.

В дисертационния труд се забелязват няколко технически грешки, свързани с дублиране на препинателни знаци.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Рецензията от мен дисертационен труд на Глория Георгиева на тема „Физиологична и биохимична характеристика на растително-микробната симбиоза на представители от род *Pseudomonas*“ съдържа оригинални научни и научно-приложни резултати с принос за науката. Той напълно отговаря на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ) и Правилника за прилагане на ЗРАСРБ. Представените резултати и публикации напълно съответстват на наукометричните изисквания за такъв труд.

Дисертационният труд недвусмислено показва, че докторант Глория Георгиева притежава теоретичните познания и професионалните умения на микробиолог и молекулярен биолог, като демонстрира качества и умения за самостоятелно провеждане на научни изследвания, вкл. и решаване на научни предизвикателства.

**Поради гореизложеното, давам положителна оценка на дисертационния труд и предлагам на уважаемото научно жури да присъди образователната и научна степен „доктор“ на Глория Георгиева в направление 4 „Природни науки, математика**

**и информатика, професионално направление 4.3 „Биологични науки“ (Микробиология).**

25.09.2024 г.

**Рецензент:** .....

(проф. д-р Светлана Браткова)