

## РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационен труд за придобиване на образователната и научна степен “доктор” по професионално направление 4.3 “Биологически науки”, научна специалност 01.06.10 “Биохимия“

*Автор на дисертационния труд:* Вероника Радомирова Делева, редовен докторант в ИФРГ – БАН, Лаборатория “Експериментална и приложна алгология”

*Тема на дисертационния труд:* “Сравнителен анализ на биологичната активност при микроводораслите *Porphyridium aerugineum* и *Chlorella vulgaris*”

*Рецензент:* Людмила Петрова Симова-Стоилова, доктор по научната специалност 01.06.10. – “Биохимия“, доцент в ИФРГ-БАН, Лаборатория “Регулация на генната експресия”

### Данни за докторанта

Вероника Радомирова Делева е завършила математическа гимназия. Висшето си образование получава през 2018 г. в Биологическия факултет на СУ „Св. Климент Охридски“, където придобива последователно бакалавърска степен по специалност „Биотехнологии“ и магистърска по “Индустриални биотехнологии”. През периода 2020-2024 г е редовен докторант в ИФРГ–БАН, лаборатория “Експериментална и приложна алгология” (ЛЕПА). Обучението в докторантура стартира под ръководството на доц. д-р Пламен Пиларски†, а след хабилитирането си неин научен ръководител става доц. д-р Юлиана Иванова. След отчисляването си с право на защита Вероника Делева е назначена като асистент в ЛЕПА на ИФРГ-БАН, където работи и понастоящем. За защита на дисертационния си труд Вероника Делева е представила необходимите документи в съответствие с Правилника за приложението на ЗРАСРБ в ИФРГ-БАН. От включената към документите професионална биография правят впечатление немалкият брой курсове и обучения, както и паралелната работа на кандидата като биотехнолог и продуктов мениджър в биотехнологични предприятия за нови продукти - органични, микробиални и биостимулиращи торове. Създава се представата за активен и целенасочен млад човек с трайни интереси към потенциала на микроводораслите в сферата на екологичните биотехнологии.

### Обща характеристика на дисертационния труд – обем и структура

Дисертационният труд на Вероника Делева е написан на 155 стандартни страници и е структуриран според изискванията на Закона за развитие на академичния състав на Република България (ЗРАСРБ) за придобиване на образователната и научна степен „доктор”. Включва разделите: Въведение (2 стр.), Литературен обзор (30 стр.), Работна хипотеза (2 стр.), Цел и задачи (1 стр.), Материали и методи (17 стр.), Резултати и обсъждане (69 стр.), Изводи (2 стр.), Приноси (2 стр.). Литературни източници (18 стр.). Основните раздели са логично структурирани в подраздели. Използваната литература включва 175 източника, като над 60% от тях са от последните 5 години. Трудът е добре онагледен с илюстративен материал, включващ 12 таблици, 3 схеми, 37 графични фигури и 11 снимки (общо 51 фигури). Даден е и подробен списък на използваните съкращения веднага след съдържанието. Оформянето на дисертационния труд е прегледно.

## **Актуалност и значимост на научната проблематика**

Екологичните проблеми, породени от десетилетия прекомерно използване на синтетични минерални торове, изискват нови практики в земеделието с постепенно внедряване на природосъобразни продукти – биостимуланти и биоторове. Микроводораслите/продуктите от тях имат огромен потенциал за използване като такива в устойчивото земеделие поради бързия си растеж и натрупването на биомаса, която се отличава с богат биохимичен състав (антиоксиданти, специфични пигменти и полизахариди, аминокиселини, фитохормони). Документирани са положителни ефекти на определени микроводорасли върху покълването, прорастването и стресоустойчивостта при някои земеделски култури, но в приложно отношение засега е изследвана само малка част от огромното биоразнообразие на микроводораслите. Необходимо е да се охарактеризират биохимичните особености и биотехнологичен потенциал на повече новоизолирани и перспективни щамове. Микроводораслите се очертават като едни от най-обещаващите кандидати за биостимуланти, тъй като съчетават висока пластичност, екологична съвместимост, биологичен произход и доказани ефекти върху растенията. Настоящата дисертация изследва в сравнителен план биостимулиращия потенциал на два щама микроводорасли от видовете *Chlorella vulgaris* и *Porphyridium aeruginum* (първият - новоизолиран и неохарактеризиран, вторият – добре известен, но неизследван досега като източник на биостимулиращи молекули за растения). Съчетават се култивиране, биохимичен анализ и експерименти върху тестови растения (*Lactuca sativa* и *Solanum lycopersicum*) при различни формулировки и концентрации на микроводорасловия материал. Дисертацията се вписва много добре в традиционната за ЛЕПА, ИФРГ тематика за скрининг на нови микроводораслови видове и щамове - продуценти биоактивни вещества с висок потенциал на приложение в различни направления, които биха могли да представляват обект на масово култивиране. Дисертацията надгражда изследванията на групата в нова посока - практическо приложение в устойчивото земеделие. По този начин дисертационният труд се явява ценен принос както във фундаментално, така и в приложно отношение.

## **Анализ и оценка на дисертационния труд**

**Въведението** към дисертационния труд е стегнато написано и дава обща представа за важността на използването на биостимуланти и биоторове в земеделието, необходимостта от съблюдаване на европейския регламент и изисквания по отношение на тези продукти, биотехнологичния потенциал на микроводораслите; ясно и целенасочено набелязва основните теми, разглеждани в дисертацията.

**Литературният обзор** е информативен и много добре структуриран. В логична последователност и подредба по теми и подтеми е разгледано приложението на микроводораслите в биотехнологиите и използването им като биостимуланти и биоторове, като са очертани както предимствата, така и предизвикателствата. Основните групи микроводорасли, използвани като биостимуланти, са описани с характерните за всяка група полезни метаболити и основни биостимулиращи ефекти при растенията. Дадена е биохимична справка за спектъра вещества, продуцирани от микроводорасли, които са от значение за използването им като биостимуланти и биоторове, и са очертани ефектите на биостимулиращо действие при покълване, растеж и развитие, при абиотичен и биотичен стрес, влиянието на микроводораслите върху почвата, почвения микробиом и минералното хранене на растенията. Обсъдени са формулировките за приложение и експериментите с растения. Направена е

сравнителна характеристика на биостимулиращ потенциал на микроводораслите *P. aeruginosa* и *C. vulgaris*. Възприемането на литературните данни е улеснено от съпоставянето им в три високоинформативни таблици и една прегледна схема. Изчерпателното изложение на литературните данни показва много добрата научна осведоменост и теоретична подготвеност на кандидата.

Доброто познаване на литературата по темата позволява да бъде убедително формулирана **работна хипотеза**, че *P. aeruginosa* и *C. vulgaris*, вследствие на различията в биохимичния си профил и в състава на получените експериментални формулировки, ще проявяват различен биостимулиращ ефект върху кълняемостта, ранното развитие и физиолого-биохимичния статус на тестовите растения - ефект, който се очаква да зависи от вида микроводорасло, приложената формулировка и дозата. Хипотезата е и визуално представена във вид на схема.

Като логично следствие от доброто познаване на литературата следва ясно и точно поставената **цел** с произтичащите **задачи** за нейното решаване. Основната цел на настоящата дисертация е да се извърши сравнителна оценка на биологичната активност на щамове *P. aeruginosa* HINDAK 1983/2 и *C. vulgaris* RJ1 въз основа на техния биохимичен профил, антиоксидантна активност и ефекта им върху тестови растения, като по този начин се определи потенциалът им за приложение като микроводораслови биостимуланти и/или биоторове. За постигането на тази цел са формулирани осем логично следващи една след друга задачи.

Раздел **Материал и методи** е написан ясно, в необходимите детайли, позволяващи възпроизвеждане. Методичният подход е адекватен на поставената цел и задачи. Обектите на изследване са добре подбрани – съпоставени са два щам микроводорасли от две различни групи и с различен биохимичен профил. Единият шам е новоизолиран от смесена микроводораслова култура и е определен като *C. vulgaris*, за него е било необходимо да се уточни и подходяща среда за култивиране и да се направи допълнителна молекулярно-биологична идентификация. Другият шам е *P. aeruginosa* Geitler (HINDAK 1983/2, Piestany, Словакия), съхраняван в колекцията на ЛЕПА, с по-различен биохимичен профил и неизследван досега като потенциален растителен биостимулант. Този подход дава възможност на докторантката да получи нови, оригинални резултати. Вероника Делева е овладяла и използва успешно широк набор от разнообразни методи – от изолиране, селектиране и морфологично охарактеризиране на щамове микроводорасли, през култивиране с поетапно мащабиране, биохимични анализи на продуцираните от щамове белтък, въглехидрати, липиди, екзополisahариди и екзоензими; определяне на антиоксидантна активност и съдържание на фитохормони, получаване на различни експериментални формулировки от микроводорасли, тестове върху растения – покълване, поникване, параметри на растежа, оценка на фотосинтетичната активност. Компонентите на отделните хранителни среди и условията за култивиране във фотобиореактор са дадени прегледно в таблици. В таблици са показани и вариантите за третиране на тестовите растения. Етапите на получаване на отделните експериментални формулировки от микроводорасловата култура са също визуално представени в схема. Използваните биохимични методи са описани подробно, ясно и точно. Направена е коректна статистическа обработка на получените експериментални данни. От прегледа на изложеното в раздел Материали и методи може да се заключи, че в процеса на обучението си Вероника Делева се е изградила като квалифициран специалист, придобила е значителен научно-изследователски опит и владее богат набор от класически и съвременни методи, които ще ѝ помогне в бъдещите научни изследвания.

Раздел **Резултати и Обсъждане** е основната и най-обемна част на дисертацията. Обединяването е по-удачно, отколкото отделното представяне на резултати и обсъждане, поради вътрешната логика на експеримента. И тук, подобно на другите раздели, изложението е подредено в последователни теми и подтеми, което значително улеснява възприемането: 1 - Изолация и идентификация на нов щам *C. vulgaris*; 2 - Култивиране и растежна динамика на изследваните микроводорасли; 3 - Морфологична характеристика на използваните щамове; 4 - Биохимичен профил на получените култури; 5 – Дезинтеграция; 6 - Анализ на ефекта на *C.vulgaris* RJ1 и *P.aeruginеum* HINDAK 1983/2 върху кълняемостта и прорастването на семена *Lactuca sativa*; 7 - Анализ на ефекта на *C. vulgaris* RJ1 и *P. aeruginеum* HINDAK 1983/2 върху растежа и развитието на *Solanum lycopersicum*. Последователно са представени трудоемките и времеемки, но крайно необходими процедури по изолирането на относително бързорастящ щам от смесена микроводораслова проба, получаване на аксенична култура и екстензивно размножаване до инокулум за подбор на оптимална хранителна среда, поэтапното мащабиране на щамовете в подбрани хранителни среди и интензивно култивиране във фотобиореактор с контролирани параметри за охарактеризиране на растежната динамика и морфология на щамовете, както и за натрупване на биомаса в количества, необходими за цял спектър биохимични анализи, уточняване на експерименталните формулировки и тестове върху растения. Сравнителният морфологичен анализ между двата вида микроводорасли показва различия - *C. vulgaris* RJ1 има относително хомогенни и компактни сферични клетки, докато клетките на *P. aeruginеum* HINDAK 1983/2 са с по-голям размер и имат изразена екзополизахаридна обвивка. Съпоставен е биохимичният състав и антиоксидантната активност на биомасата от двата щама, прилагайки класически биохимични методи, екзоензимния им спектър - с помощта на теста за качествен анализ APIZYUM, съдържащ 20 различни субстрата за специфични ензими, а фитохормоните секретирани в културалната среда - посредством LC-MS/MS. За всеки биохимичен показател има коментар, сравняващ двата изследвани щама, съпоставянето е и нагледно представено в таблици. Намерените различия са очаквани от гледна точка видова специфика на щамовете, но се дискутират най-вече спрямо техния биотехнологичен потенциал. Степента на дезинтеграция на водорасловата биомаса е изследвана в зависимост от приложеното налягане, концентрацията на биомасата и времето на хомогенизиране. Установени са някои закономерности, грамотно изтълкувани според съвременните научни представи за влиянието на клетъчната архитектура и процесните параметри върху ефективността на дезинтеграцията, и са подбрани най-ефективните условия. Доколкото ми е известно, тестове за биостимулантен ефект на микроводораслови препарати върху покълване, растеж и физиологични параметри на растения за пръв път се правят в ИФРГ. Установено е, че за стимулиране на покълването при *L. sativa* по-подходящо е прилагане на *C. vulgaris* RJ1 под формата на биомаса, докато *P. aeruginеum* HINDAK 1983/2 - както като биомаса, така и под формата на супернатант или цяла клетъчна култура. Установено е видово-и фракционно-специфично действие, както и дозозависимост на ефекта, върху растежа на прорастъците - ниските концентрации стимулират, докато по-високите концентрации могат да предизвикат слабо инхибиране на растежа. *C. vulgaris* RJ1 има по-силен общ ефект върху надземния растеж, докато при *P. aeruginеum* HINDAK 1983/2 биомасата стимулира предимно корена, а вариантите богати на екзометаболити стимулират по-силно надземните части. При *C. vulgaris* ефектът е по-изразен при ниски концентрации и е свързан главно с клетъчните компоненти, което насочва към водеща роля на вътреклетъчни растежни фактори. При *P. aeruginеum* биостимулиращото действие е по-комплексно, с участие както на ендогенни, така и на екзогенни метаболити. Оценката на биостимулиращия ефект върху растежа (дължина на

корен и надземна част, брой листа, диаметър на стъблото, свежа и суха биомаса) и някои физиологични процеси (фотосинтеза, транспирация, ефективност на използване на водата) при млади фотосинтезиращи растения *S. Lycopersicum* показва, че при *P. aeruginosum* HINDAK 1983/2 е по-силно изразен ефектът върху кореновото развитие, общия растеж и натрупването на свежа и суха биомаса, докато при *C. vulgaris* RJ1 по-ясно се откроява физиологичната активност на освободените вътреклетъчни и извънклетъчни метаболити, особено по отношение на нетната фотосинтетична скорост и пигментния статус. От прегледа на изложеното в раздел Резултати и Обсъждане може да се каже, че е извършена значителна по обем експериментална работа и са получени съществени резултати. Добро впечатление прави коректното сравняване на изследваните два щама за всеки конкретен анализ. Получените резултати убедително доказват, че проучваните щамове *C. vulgaris* RJ1 и *P. aeruginosum* HINDAK 1983/2 са подходящи източници на биостимулаторни вещества с потенциално приложение в устойчивото земеделие. Описаните резултати са добре онагледени с 11 снимки, 3 таблици и 37 фигури). Дискутирани са компетентно на базата на сравнителен анализ и съпоставяне с литературните данни по темата, като е коментирана необходимостта от допълнителни изследвания за потвърждаване на биостимулиращите ефекти и при други растителни видове и условия на отглеждане, както и при стресови въздействия.

Направените 12 **изводи** са добре формулирани и са в пълно съответствие с получените резултати. Очертани са 7 **приноси**, които бих определила като методични, научни и научно-приложни.

Към методичните приноси бих отнесла:

принос 1. - разработена и приложена е цялостна сравнителна експериментална схема за оценка на биологичната активност на щамове микроводорасли;

принос 7 - Оптимизирани са условията за дезинтеграция на биомасата на двата щама.

Към приносите с фундаментален характер:

принос 2: За първи път е изследван биостимулиращият потенциал на вида *P. aeruginosum* по отношение на ефекта му върху растежа и развитието на растенията.

Останалите четири приноса имат подчертано научно-приложно значение, което ни най малко не омаловажава стойността им.

**Авторефератът** е с обем от 57 страници, оформен е според изискванията, като неговата структура и съдържание съответстват на дисертационния труд и представят коректно целите и задачите на проучването, използваните материали и методи, основните резултати, изводи и приноси. Приложен е на български и на английски език.

Дисертацията и авторефератът са написани на добър професионален език.

Преценка на **публикациите** по дисертационния труд. Резултати от изследванията са публикувани в 2 научни статии - едната във *Fermentation* 2024 (Q2), а другата е приета за печат в *Bulg. J. of Agricultural Sciences* (Q3). Представените публикации по дисертацията покриват изискванията на ИФРГ-БАН за допускане до защита на дисертационен труд. Част от резултатите от дисертационния труд са представени в едно устно и едно постерно съобщение на международни конференции, както и в един доклад и един постер на национални научни събития. В приетата за печат статия и във всички участия с постери и доклади, свързани с дисертационната разработка, докторантката е първи автор, което доказва активно лично

участие. Забелязани са 12 цитата на статията във *Fermentation*, което доказва актуалността на изследванията и повишения интерес към биостимулантния потенциал на микроводораслите

Към дисертационния труд имам някои забележки, препоръки и въпроси:

#### **Забележки и препоръки:**

1. Методична част 12.3. „Инокулиране“ на семената – не считам, че терминът е удачен, въпреки че се разбира за какво се отнася. По-скоро става въпрос за третиране .
2. Резултати и обсъждане– на няколко места се споменава „летораст“ в смисъл на shoot, но тази дума в българския означава не надземна част на растение, а млада клонка, филиз, издънка при овошки и лози. Също така „разсад“ в смисъл на seedling не е добър превод от английски- означава млади растения, нагъсто засяти и готови за пресаждане.
3. Някои от графичните фигури с много варианти и стълбчета само в два цвята са претоварени и се затруднява възприемането им. Би могло данните да се прегрупират, като различните концентрации от вариантите F1, F2, F3, F4 и F5 се поставят една до друга като по-едри блокове в един цвят. Така визуално да могат да се сравнят по-лесно – не 32, а 10-12 варианта, като се открие и концентрационната зависимост.

#### **Въпроси:**

1. Бихте ли разяснили същността на хорметичните ефекти?
2. Смятате ли да валидирате резултатите от качествения скрининг за екзоензими с допълнителни количествени биохимични анализи?
3. Предвиждат ли се бъдещи експерименти по ефект на микроводорасловите биостимуланти върху устойчивостта на растенията към абиотичен и биотичен стрес? Кои експериментални формулировки от изследваните щамове биха повлияли благоприятно на средоустойчивостта и защо?

#### **Заклучение**

По актуалност на разработваната проблематика, обем и качество на изследванията, приносен характер на резултатите и публикационна дейност дисертационният труд напълно отговаря на изискванията на ЗРАСРБ и на Правилника за специфичните условия и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в ИФРГ-БАН. Вероника Делева показва задълбочени теоретични познания в областта на биостимулантния потенциал на микроводораслите, добра методическа подготовка, умение да провежда експерименти и да систематизира и интерпретира получените резултати. Всичко това характеризира Вероника Делева като един напълно подготвен изследовател в областта на биохимията и биотехнологията на водораслите и е предпоставка за бъдещото ѝ успешно развитие като учен. Като член на Научното жури убедено гласувам положително и препоръчвам на уважаемите членове на Научното жури да се присъди образователната и научна степен „доктор“ на Вероника Радомирова Делева в област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3. Биологически науки, научна специалност 01.06.10 „Биохимия“.

Дата: 03.06.2026

Рецензент:

(доц. д-р Л. Симова-Стоилова)