АГРОБИОИНСТИТУТ - Костинброд
София, бул. "Цар Борис III" №
тел.: 952 54 07/факс: 952 54 06
Вх. №20-7 /05.09.2019г.

РЕЦЕНЗИЯ

от проф., доктор Елена Иванова Георгиева

на дисертационния труд на **Мила Градева Русанова** ***„Характеризиране на биоразнообразието на аборигенни дрожди и ендофитни гъби и проучване на ефекта от ферментация на отпадни води от производство на розово масло“*** представен за присъждане на научната и образователна степен **„Доктор”**, в Област на висшето образование 4. „Природни науки, математика и информатика”, Професионално направление 4.3. Биологически науки, Докторска програма **„Генетика“**

Научен ръководител: проф. дн Иван Илиев Атанасов

1. Общо описание на представените материали

Със заповед № РД-04-71/22.07.2019 г. на Председателя на ССА съм определена за член на научното жури за осигуряване на процедура за защита на дисертационния труд на Мила Градева Русанова, докторант на самостоятелна подготовка в Агробиоинститут, ССА. Научно изследователската работа е изпълнена под вещото научно ръководство на проф. доктор Иван Илиев Атанасов от Агробиоинститута към ССА. Дисертационният труд е написан на 160 страници, включва 38 фигури, 21 таблици, 1 диаграма и 364 литературни източници.

Представените от Мила Русанова материали на хартиен и електронен носител са в пълно съответствие с Правилника за развитие на академичния състав на РБ и включва всички необходими документи, както и такива изискващи нотариална заверка.

2. Кратки биографични данни за докторанта

Мила Градева Русанова е родена в гр. София на 27.03.1972. През 1996 завършва с отличие висшето си образование с ОКС „Магистър“, специалност „Клетъчна биология и биология на развитието“, към катедра „Цитология, ембриология и хистология“ на Биологическия Факултет, СУ "Св. Климент Охридски". През 1997 постъпва на работа като биолог в Агробиоинститута, ССА, където и досега изпълнява същата длъжност. С решение на Научния съвет на института от 2016 г. Русанова е зачислена в докторантура на самостоятелна подготовка, а от 24.04.2019 е отчислена с право на защита. До сега тя е публикувала 11 научни статии, от които 3 са изцяло по темата на дисертацията. Забелязани са и 111 цитирания. Мила Русанова е представила списък с публикувани резюмета от 10 участия с постери и устни презентации на национални и международни конгреси. Участвала е в изпълнението на 4 проекта и е била ръководител на научен екип в един проект финансиран от конкурсната сесия „Млади учени“ на ФНИ към МОН. В периода от 2000-2014 година има проведени няколко краткосрочни специализации в престижни изследователски институти в Швейцария, Корея и Белгия, които са допринесли за нейното научно и кариерно развитие.

3. Актуалност на тематиката и целесъобразност на поставените цели и задачи

Дисертационният труд на Мила Русанова третира актуален, интересен и труден за разработване проблем в научно и научно-приложно отношение. Страната ни е една от големите производителки, снабдяваща световния пазар с розово масло добивано чрез дестилация на цветовете на маслодайната роза (*Rosa damascena* Mill.), от която се получават голямо количество отпадни продукти от отработения розов цвят и водата, в която той е дестилиран. Досега в България, а и в другите страни производители на

розово масло, не съществува разработена технология за преработване на отпадните води и оползотворяване на съдържащите се в тях полезни съединения. Изследванията, в този научен труд, целят изучаване и разширяване на възможностите за оползотворяване на отпадната вода от промишлена дестилация на розово масло под въздействие на изолати на ендофитни гъби, получени от лечебни и ароматни растения и аборигенни щамове дрожди.

От представените данни е видно, че разработваната научна теза е иновативен и актуален подход към създаване и прилагане на технология за екстракция и добив на биологично активни съединения от отпадни води при производство на розово масло и важна стъпка за управление на отпадъците с цел възстановяване, биоконверсия и оползотворяване на ценните им съставки, както и нови, строго научни, мерки за предпазване на околната среда от замърсяване с тези отпадъци.

4. Познаване на проблема

Литературният обзор обхваща около 50 страници, а умелото представяне на известните данни по проблема и задълбоченото оценяване на литературния материал са обосновани с 364 цитирани източници. С отличните си познания по темата на дисертацията докторантката убедително доказва необходимостта от планираните проучвания. Литературният обзор включва пет раздела, в които нагледно, компетентно и в логическа последователност са разгледани възможностите за оползотворяване на отпадната вода от получаването на розово масло. Демонстриран е потенциалът за модифициране на състава и биосинтез на нови съединения чрез ферментация на отпадната вода с тествани изолати от изолирани ендофитни гъби. Проучена е и възможността за използване на отпадната вода като култивационна среда за добив на гъбна маса от гъбен щам *Trichoderma asperellum* SL-45 и е анализирано влиянието върху фенолния състав след приключване на култивацията. Особено внимание е отделено на промишлени отпадни води богати на фенолни съединения от обработка и детоксификация на маслини за производство на зехтин. Разгледани са всички основни физични, топлинни, химични и биологични методи за обработка, биотрансформация и биоремедиация на отпадни води от получаване на зехтин, както и най-ефективните методи за екстракция на фенолни съединения и тяхното оползотворяване. Обобщени са публикувани данни за извличане и оползотворяване на фенолни съединения от отпадъци от производство на розово масло. Много добро впечатление прави анализа на съвременните молекулярни методи за характеризиране на микробиалното съдържание и биоразнообразие в проби от околната среда. В четвъртата глава от обзора докторантката показва, че благодарение на много по-ефективните молекулярни техники, изучаването на генетичното и функционално разнообразие на микроорганизмите от тези съобщества има важно значение за широк кръг дейности и цели, включително в биоремедиация, генериране на енергия и редица биотехнологични производства. В последната, пета част акцентът е поставен върху разпространението, биоразнообразието и функционалната роля на ендофити, изолирани от лечебни и ароматни растения, при производство на биоактивни вторични метаболити.

Прегледа на състоянието на публикуваната информация, компетентната интерпретация на нерешените проблеми в изследваната област и критичния поглед разкриват много добрата биологична култура на докторантката, което и е позволило ло-

гично да постави целта и задачите за постигането й при разработването на дисертационния труд. Поставените шест задачи са формулирани лаконично и ясно.

5. Методика на изследването

Правилният подбор и детайлното описание на приложените методи е гаранция за достоверност на резултатите и възможност за възпроизвеждането им в други лаборатории. В дисертационния си труд Русанова е постигнала целта и е получила достоверни резултати на поставените от нея задачи с използването на каскада от правилно подбрани съвременни методи. Професионалната й подготовка се потвърждава от множество усвоени, компетентно описани и адекватно приложени съвременни микроскопски, микробиологични, генетични, клетъчно-биологични, статистически и молекулярни техники. Голямата гама от техники започва с оценка на различните методи за екстракция на фенолни съединения от отпадни води от производство на розово масло, преминава с анализ на ефективността на адсорбция и десорбция на фенолни съединения при екстракция със смола SP207 и продължава с HPLC-UV и HPLC–PDA-ESIMS анализи на пречистване на фенолни екстракти и структурен анализ, чрез ядрено магнитен резонанс на пречистени с HPLC съединения. Биоразнообразието на дрожди и гъбни изолати и тяхната идентификация е постигнато чрез прилагане на съвременни молекулярно-генетични техники като: изолиране на геномна ДНК, PCR, рестрикционен анализ, секвениране на ДНК последователности, трансформация на компетентни клетки *E.coli DH5α* чрез прилагане на топлинен шок и др. С помощта на софтуерния пакет MEGA v4 е направен и филогенетичен анализ на получените ДНК секвенции на вътрешните транскрибируеми области.

6. Характеристика и оценка на дисертационния труд

Раздела „Резултати и обсъждане" обхваща 51 страници, състои се от 5 глави, всяка с няколко подраздели съответстващи на дефинираните задачи. В него са дадени добре оформени доказателствени данни на поставените за разрешаване задачи. Отлично впечатление прави обсъждането на резултатите. Докторантката успешно съпоставя собствените си резултати и им намира достойно място сред големия обем публикувана световна литература, което е показател за нейната ерудиция и висока научна подготовка. В повечето от случаите информацията в литературата за химичния състав на отпадъчния отработен розов цвят е ограничена, а също липсва детайлен анализ на състава на отпадната вода от дестилацията на розово масло. Получените от Русанова резултати дефинират логична последователност от изследователски решения започващи още в първата глава с разработване на методи за екстракция на фенолни съединения от отпадни води при производство на розово масло. Голяма част от наличните методи за екстракция на фенолни съединения са високо токсични, което е основание докторантката да търси други по-продуктивни и щадящи околната среда методи за екстракция. За оценяване ефективността на процеса на екстракция при различните използвани методи докторантката е проследила количеството на общи феноли, общи и редуциращи захари, антиоксидантна активност и pH на получените екстракти. За целта тя е проучила възможностите за извличане на тези съединения чрез течни разтворители и чрез твърдофазна екстракция с адсорбентни смоли. От тестваните 13 макропорести адсорбентни смоли Русанова намира, че при използване на смола SP207 екстракцията на всички основни фенолни съединения е най-ефективна и добива на

биоактивни фенолни съединения след обработка на отпадни води е най-висок. Резултатите на докторантката показват, че този метод на екстракция на фенолни съединения чрез адсорбция/десорбция със смола SP207, позволява извличане на 80-90% от съдържащите се в нея полифеноли. Чрез HPLC-PDA-ESIMS и HPLC-PDA-ELSD анализи на проби от отпадна вода от дестилация на розово масло и лиофилизирана проба от обогатения на фенолни съединения екстракт, тя доказва, че основните фенолни съединения в получения чрез многократна циклична екстракция със смола SP207 екстракт, означен като фракция RF20 и изходната отпадна вода са представени основно от флавоноли на основата на кемпферол и кверцетин, елагова киселина и фенилетилглюкопиранозид.

В следващия раздел, чрез прецизно подбрани молекулярни техники докторантката е характеризирала биоразнообразието на дрожди и плесени в проби, получени от ранна ферментация на отпадна вода при преработка на розово масло, от течни проби от отработен депониран розов цвят и ендофити от цветни пъпки на *R. damascena* Mill. По литературни данни е установено, че в богати на феноли отпадни води доминиращите микроорганизми са дрожди, адаптирани към високото съдържание на феноли и притежаващи потенциал за тяхното метаболизиране. Високото съдържание на феноли в отпадни води от производството на розово масло, логически насочва изследванията на Русанова върху биоразнообразието на присъстващи в тези води видове дрожди и тяхното идентифициране. Специално внимание заслужават резултатите от метагеномния анализ, на който докторантката подлага два вида проби - проби от отпадни води след десетдневна ферментация в стерилна бутилка и течни проби от отработен депониран в лагуна общ отпадък включващ остатъци от розов цвят и отпадна вода. От двете проби е изолирана тотална ДНК и използвана за метагеномен анализ на биоразнообразието на присъстващи в пробите дрожди и гъби. След PCR амплификация с универсални праймери (ITS1 и ITS4) за вътрешния транскрибируем спейсър (ITS) на рДНК, амплифицираните и пречистени ITS фрагменти са клонирани в плазмиден вектор pJET1.2/E.coli. След секвениране на избрани клонове и BLAST анализ, Русанова използва получените данни за конструиране на филогенетично дърво, което показва, че ранната ферментация на отпадна вода от дестилация на розово масло протича с участието на ендофитни аборигенни дрожди от родовете *Cyberlindnera* и *Pichia*, които присъстват в розовия цвят още преди дестилацията на розово масло. Прецизно анализираните резултати от тези експерименти са дали възможност на докторантката да установи, че ферментацията на отпадна вода с аборигенни дрожди води до редуциране на съдържанието на фенолни съединения, както и до биотрансформация дължаща се основно на консумиране на захарите. От приложените графики, фигури и таблици ясно е демонстрирана възможността за използване на ферментацията с аборигенни дрожди за насочено модифициране на състава на фенолите в отпадна вода от дестилация на розово масло преди тяхната екстракция и следваща преработка.

Полезна и с научна и с научно-практична стойност задача, която докторантката си поставя е да докаже, че лечебни и ароматни растения могат да бъдат използвани като богат източник на ендофитни гъби. Тази част от дисертационната работа представя резултати от изолиране и характеризиране на ендофитни гъби от набор лечебни и ароматни растения, както и тестване на капацитета им за ферментация на отпадните води и модификация на фенолния състав. Следват убедителни експериментални дока-

зателства и задълбочена интерпретация за идентификацията на изолираните ендофитни гъби от лечебни и ароматни растения и изследване на потенциала им за ферментация на отпадна вода от дестилация на розово масло и биотрансформация на фенолни съединения. Доказателство за огромния експериментален труд на Русанова са получените от нея 139 изолата след *in vitro* култивиране на листни експланти от 20 медицински и етерично-маслени растения. Демонстриран е потенциалът за модифициране на състава и биосинтез на нови съединения чрез ферментация на отпадна вода от дестилация на розово масло с тествани изолати от ендофитните гъби. Филогенетичният анализ на основа на ITS последователностите, получени от изолатите, ги групира в 16 отделни клъстера, които се доближават до известни щамове на *Alternaria sp., Aureobasidium pullulans, Bipolaris sp., Botrytis cinerea, Cercospora sp., Colletotrichum sp., Epicoccum nigrum, Fusarium sp., Phoma sp., Phomopsis sp., Septoria sp., Stemphylium sp.*

Ферментацията на отпадна вода от дестилация на розово масло с аборигенни дрожди и ендофитни гъби може да бъде използвана за целенасочена промяна на фенолния профил на получения екстракт с цел разширяване на неговото приложение, дължащо се на потенциална промяна в биологичната му активност

Специално заслужава да се открои постижението на автора с почвените гъби от род *Trichoderma,* които са известни с широк обхват на промишлени приложения, тъй като редица представители на рода проявяват стимулиращо влияние върху растежа на културните растения и имат защитен ефект срещу растителни патогени. Русанова установява интересен резултат и показва, че отпадна вода от дестилация на розово масло може да бъде източник на евтина течна среда за култивиране на щам *Trichoderma asperellum* SL-45. Протичащата ферментация с този щам не води до промяна на фенолния профил на получения екстракт от отпадната вода и може да бъде използвана като допълваща стъпка към екстракцията на фенолни съединения.

7. Приноси и значимост на разработката за науката и практиката

Изследванията отразени в научния труд на Мила Русанова имат подчертано научно и научно-приложен характер. Промишлената дестилация на розово масло от цветовете на *Rosa damascena* се основава на сортове рози с ограничено генетично разнообразие. При промишлената дестилация на розово масло се освобождават големи количества богати на феноли отпадни води с много сходен състав и параметри. Въпреки успешната екстракция на феноли от отпадни води и докладваните биологични активности на получените от тях фенолни екстракти, потенциалът за валоризация на фенолните съединения остава все още неизползван. Резултатите от настоящото изследване откриват нов път за валоризация на отпадни води от промишлена дестилация на розово масло и подобни на нея богати на феноли отпадни води от аграрната промишленост. При сравнително ниска цена, резултатите от настоящото изследване предлагат генериране на широк спектър от фенолни екстракти, които се различават по състав и възможно приложение. Резултатите от този научен труд могат да предложат внедряване на нова технология в етерично маслената промишленост за екстракция и добив на биологично активни фенолни съединения от отпадни води от производство на розово масло, както и да намалят екологичния риск от сега практикуваното директно освобождаване на тези отпадни води в околната среда.

8. Преценка на публикациите по дисертационния труд

Мила Русанова представя списък с 11 научни статии, цитирани 111 пъти. Резултатите, които са изцяло по темата от дисертационния труд са публикувани в 3 статии, две в списания с ИФ (общ ИФ **3.249**) и една в годишника на Софийски университет. В две от статиите тя е водещ автор, а тази в Planta Medica е на трета позиция. В документите има приложен и списък от 10 участия на национални и международни конгреси, от които по темата на дисертацията са 2 участия с постери на международна конференция в гр. Пловдив. По темата на дисертацията е участвала в изпълнението на 2 научни проекта.

9. Лично участие на докторантката

От представените резултати считам, че докторантката лично е извършила проведеното дисертационно изследване. Получените резултати от Русанова са обобщени в 14 извода и 4 приноси, които са в съгласие с получените резултати и отразяват оригиналността на разработката. Убедено считам, че те са реални нейни постижения.

10. Автореферат

Запозната съм с проекта за автореферат и намирам, че е направен според изискванията и адекватно отразява основните резултати постигнати в дисертацията.

11. Критични забележки и препоръки

Дисертацията на Русанова е написана професионално. Нямам по същество критични забележки. На страница 94 вместо фигура 13 е написана и дискутирана фигура 12. Има доста съкращения с латинска абревиатура което на места затруднява четенето и осмислянето на резултатите. Тези грешки са от технически характер и те не намаляват стойността на настоящата дисертация.

13. Препоръки за бъдещо използване на дисертационните приноси и резултати

Темата на този научен труд е важен и сполучлив опит да се изготви дългосрочна програма за предотвратяване на замърсяванията причинени от промишленото производство на розово масло. Тя е свързана не само с научното развитие на проблема, но дава и нова алтернатива за бъдещи проучвания .

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд ***съдържа научни и научно-приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката*** и **отговарят на всички** изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и съответния Правилник на ССА. Дисертационният труд показва, че докторантката Мила Русанова притежава задълбочени теоретични знания и професионални умения по научна специалност Генетика като демонстрира качества и умения за самостоятелно провеждане на научно изследване, висока компетентност, формулиране, дизайн и планиране на експеримент, анализ и интерпретация на научни резултати.

В контекста на гореизложеното, убедено давам своята ***положителна оценка*** за проведеното изследване и ***предлагам на почитаемото научно жури да присъди образователната и научна степен „Доктор“*** на Мила Градева Русанова.

05.09. 2019 г.

Рецензент:

/Проф. доктор Елена Георгиева/