



ПЛОВДИВСКИ УНИВЕРСИТЕТ «ПАИСИЙ ХИЛЕНДАРСКИ»  
БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ  
Катедра «Ботаника и МОБ»



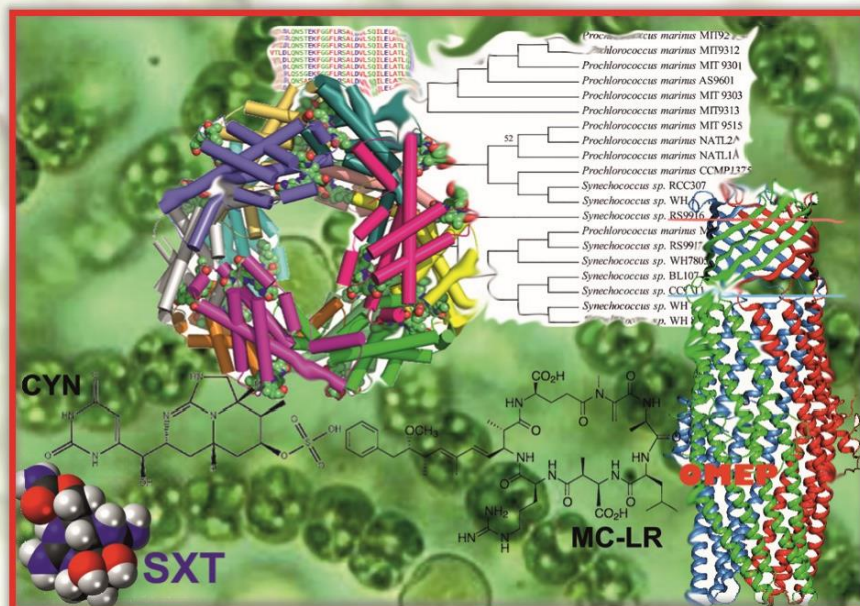
Дияна Русева Башева

**ПОЛИФАЗНА ХАРАКТЕРИСТИКА  
НА ЦИАНОБАКТЕРИАЛНИ ЩАМОВЕ С НЕИЗЯСНЕН  
ТАКСОНОМИЧЕН СТАТУС**

**АВТОРЕФЕРАТ**

на дисертационен труд  
за присъждане на образователната и научна степен «доктор»

Област на висше образование: **4. Природни науки, математика и информатика,**  
Професионално направление: **4.3 Биологически науки**  
Научна специалност: **Ботаника**



**Научни ръководители:**

*проф. д-р Румен Димитров Младенов*

*доц. д-р Иванка Иванова Тенева*

**Пловдив, 2021 г.**



ПЛОВДИВСКИ УНИВЕРСИТЕТ „ПАИСИЙ ХИЛЕНДАРСКИ”  
БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ  
Катедра „Ботаника и МОБ“



*Дияна Русева Башева*

**ПОЛИФАЗНА ХАРАКТЕРИСТИКА  
НА ЦИАНОБАКТЕРИАЛНИ ЩАМОВЕ С НЕИЗЯСНЕН  
ТАКСОНОМИЧЕН СТАТУС**

**АВТОРЕФЕРАТ**

на дисертационен труд

за получаване на образователната и научна степен «**доктор**»

Област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика,

Професионално направление: 4.3 Биологически науки

Научна специалност: Ботаника

**Научни ръководители:**

проф. д-р Румен Димитров Младенов

доц. д-р Иванка Иванова Тенева

**Пловдив, 2021 г.**

Дисертационният труд съдържа 129 страници, 10 таблици, 23 фигури и 224 литературни източника.

Изследванията са извършени в научните лаборатории на катедра „Ботаника и МОБ“ към Биологически факултет на Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“.

Дисертационният труд е обсъден и предложен за защита на разширен катедрен съвет на катедра „Ботаника и МОБ“, Биологически факултет, ПУ „П. Хилендарски“ (Протокол № 145 от 20.05.2021 г.).

Откритото заключително заседание на научното жури ще се състои на 17.09.2021 г. от 15:00 часа в 14 аудитория на Биологически факултет (гр. Пловдив ул. Тодор Самодумов № 2).

Материалите по защитата са предоставени за свободен достъп на интересуваните се в библиотеката на ПУ „Паисий Хилендарски“.

**Научно жури:**

проф. дбн Искра Иванова

проф. д-р Снежанка Мончева

проф. д-р Иванка Димитрова

проф. д-р Румен Младенов

доц. д-р Кремена Благовестова Стефанова

**Автор:** Дияна Русева Башева

**Тема:** Полифазна характеристика на цианобактериални щамове с неизяснен таксономичен статус

## 1. Въведение

Цианобактериите (Cyanobacteria, Cyanoprokaryota) са древна, уникална група фотосинтезиращи организми с прокариотна организация. Те са високоадаптивни, космополитно разпространени автотрофи, които все по-често се съобщават като доминираща група във фитопланктона на водоемите, които обитават. Определят ги като едни от основните първични продуценти на биомаса на планетата.

Еволюцията им, започнала преди най-малко 2,5 милиарда години, дава основание на учените да отредят на тези организми водеща роля в теорията за ендосимбиозата и да ги свържат с появата на хлоропластите при висшите растения. Заради способността на някои цианобактериални представители (притежаващи хетероцисти) да фиксират атмосферен азот, те са предпочитани симбионти за животни, гъби и висши растения. Цианобактериите са известни като продуценти на редица биологично активни вещества с антитуморна и антифунгална активност, хормони, имуносупресори и токсини. Дали продуцираните от тях цианотоксини ще достигат опасно високи концентрации във водоемите или не, зависи от таксономичния състав на фитопланктона, както и от цианобактериалната биомаса, чието масово развитие („цъфтеж“) се определя от редица локални и глобални фактори. Цианобактериите се откриват в почти всяка водна екосистема, но все пак тяхното присъствие не означава автоматично риск за общественото здраве.

Дългата и сложна еволюция на цианобактериите (често съпътствана от хоризонтален генен трансфер) определя тяхното голямо биологично разнообразие и ги прави трудна за класифициране група. Таксономичната класификация е основния метод за оценка на биологичното разнообразие на организмите в контекста на непрекъснатото променящите се знания за еволюционните, генетичните и екологични взаимоотношения и фенотипни вариации. Правилната таксономична позиция и идентификация на цианопрокариотните видове е много важна за всички изследвания – настоящи и бъдещи, свързани с биологичната активност на цианобактериите, тяхното биотехнологично приложение или при управлението и мониторинга на водите.

Както за всички организми, ключовите критерии за класифициране на цианобактериите в таксономична система са филогенетичните връзки, които трябва да отразяват групирането на организмите в йерархични таксони. В исторически план, таксономичната класификация на групата се базира на морфологичните характеристики на клетките и колонииите, изследвани чрез микроскопия. През последните няколко десетилетия, биохимичните и молекулярните методи се използват все по-често в цианобактериалната таксономия. Въз основа на молекулярни данни, редица класически цианобактериални таксони са ревизирани и преименувани. В последните години таксономията и систематиката на отдел Cyanobacteria е в процес

на активна реорганизация. Това е процес, който засяга не само цианобактериите, но и редица други растителни, гъбни и животински таксони. Случващото се е разбираемо предвид огромното количество нови данни, натрупани основно от молекулярно генетични изследвания и стремежа те да бъдат използвани.

Филогенетичните реконструкции в изследванията с таксономична цел се базират основно на секвенциите на 16S рРНК. Този ген е част от групата на SSU рРНК гените и е в основата на научните изследвания за филогенетичните взаимовръзки при *Cyanobacteria* вече десетилетия наред. Той се оказва ефективен молекулярно-генетичен маркер за извеждане на филогенетични връзки между различните родове в рамките на разределите, предложени от Komárek и Anagnostidis (2005), но не е много информативен, когато се прилага на по-ниско таксономично ниво, например вид. 16S рРНК се използва като основен маркер при таксономичната класификация на отдел *Cyanobacteria*. В последните години, информацията, получена от 16S рРНК се допълва от други гени, смятани за подходящи при родово и видово детерминиране, а именно *rpoC1*, *rpoB*, *gyrB*, *rbcLX*, *srcBA-IGS* и *rRNA-ITS*.

При таксономията на отдел *Cyanobacteria* се прилага широко възприетия и от ботаници и от бактериолози подход, наречен полифазна таксономия. Това е подход обединяващ молекулярно-генетични, морфологични, ултраструктурни, биохимични и екологични данни като приоритет се дава на молекулярно-генетичните данни, а другите са приемат за допълващи. Проблемът е в това, че наложените правила се интерпретират по странен субективен начин и често давайки приоритет на новото се пренебрегва добре работещото старо. Какво се получава на практика. На базата основно на молекулярно генетични данни комбинирани в повечето случай само с цитоморфологични с лека ръка се отделят нови родове (често само с по 2 – 3 представителя) и се преименуват широко разпространени видове. Няма го пълния набор от данни, който да потвърди и да убеди в необходимата промяна. Дори и да приемем, че донякъде се спазват принципите на полифазната таксономия трябва да се има предвид, че 16S рРНК не е маркер, даващ възможност за подродово детерминиране и затова използването на други генетични маркери при решаването на таксономични казуси не би трябвало да се пренебрегва. Освен това, използването на допълващи ултраструктурни, биохимични и екологични данни би трябвало да е изискване. В противен случай се стига до таксономични промени, които не са достатъчно добре обосновани и са спорни. Прицелни се явяват полифилетични родове като *Phormidium*, *Microcoleus* и *Leptolyngbya* и таксони, при които морфологичните критерии се припокриват и не са достатъчно дискриптивни за вземане на категорични решения.

На този етап от реорганизацията на цианобактериалната таксономия от изключително значение е допълването и развиването на познанието за



различните таксономични критерии (молекулярно-генетичния, морфологичния, ултраструктурния, биохимичния и екологичния), които биха дали възможност за детайлизиране и прецизиране на информацията, основа за таксономията и систематиката на цианобактериите. Възможностите за прилагане на цялата тази гама правила за съжаление все още е само желателна, но не и ясно дефинирана. Необходима е конвенция за по-нататъшен напредък в науката за цианобактериите, а систематиката и таксономията са крайъгълния камък и основа за всички по-нататъшни изследвания.

Затова считаме, че настоящия дисертационен труд има своя значим принос към допълването и развиването на полифазния подход в таксономията на цианобактериите, чрез разширяване на познанието за различните таксономични критерии: молекулярно генетичен, биохимичен и екологичен.

## **2. Литературен обзор**

Литературният обзор включва следните основни раздели:

2.1. Отдел *Cyanobacteria* – обща характеристика

2.2. Систематика на отдел *Cyanobacteria* – историческо развитие.

Подходи в изследването на цианобактериите – ретроспекция

2.3. Съвременни схващания за таксономията на отдела. Проблеми.

Полифазна таксономия.

2.4. Молекулярни методи в цианобактериалната таксономия. Филогения.

2.5. Геномна ера – секвениране на цели цианопрокариотни геноми

2.6. Размер, организация и пloidия на цианобактериалните геноми

## **3. Цел и задачи**

**Основната цел** на настоящия дисертационен труд е установяване и валидиране на нови биомаркери за определяне таксономичния статус на цианобактериални видове чрез прилагане на полифазен подход.

За постигането на поставената цел бяха формулирани следните **задачи**:

(1) Проучване на съществуващите бази данни за геномни и протеинни секвенции на цианобактерии;

(2) Анализ на наличните пълни геномни секвенции на цианобактерии в различните бази данни;

(3) Подбор на специфични протеини, подходящи за филогенетично моделиране и определяне таксономичния статус на близки цианобактерии;

(4) Валидиране на селектираните маркери за филогенетично моделиране на близкородствените взаимоотношения между отделни групи цианобактерии чрез използване на различни методи за филогенетични анализи;

(5) Сравнение на новоустановените специфични маркери с традиционно използваните 16S рРНК генни секвенции за филогенетичен анализ и таксономия на цианобактерии;

(6) Практическо валидиране на новопредложените маркери чрез използване на цианобактериални щамове от РАСС, поддържана от катедра „Ботаника и МОБ“ към Биологически факултет на ПУ „Паисий Хилендарски“.

(7) Оценка на качествено и количествено съдържание на фикобилепротеини в цианобактериални щамове и възможността за тяхното приложение като биохимични маркери за решаване на таксономични проблеми.

(8) Прилагане принципите на полифазния подход при определяне таксономичната принадлежност на аеробен пикопланктон от природни проби.

## 4. Материали и методи

### 4.1. Материали и методи свързани с молекулярно генетичните методи и филогенетични анализи

#### 4.1.1. Цианопрокариотни щамове и култивиране

За провеждане на експерименталната част, свързана с амплифициране на **външен мембранен ефлукс протеин (Outer Membrane Efflux Protein, ОМЕР)** и неговото валидиране са използвани осем алгологично чисти култури, съхранявани в алгологичната колекция (РАСС) при Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“ - две от род *Nostoc* и по една от родовете *Phormidium*, *Microcoleus*, *Phormidesmis*, *Pseudanabaena*, *Tolypothrix* и *Anabaena*. Данните за произхода, таксономичната принадлежност и идентификационен код на щамовете са представени в Таблица 1. Таксономичният статус на изследваните видове е определен въз основа на морфологични описания, направени от Komárek & Anagnostidis (2005). Цианобактериалните култури са култивирани на течна хранителна среда «Z» (Staub, 1961) в култивационен блок. Културите са синхронизирани при фотопериод 15:9 h (светло:тъмно) и температура 26-27°C. Режимът на култивиране е избран така, че да се доближава максимално до условията за развитие на цианобактериалните щамове през летните месеци в природните хабитати.

#### 4.1.2. Изолиране на ДНК

Геномната ДНК, използвана за амплифициране на ОМЕР с последващо сенвениране е екстрахирана от 40 mg прясна цианопрокариотна маса чрез използване на екстракционния ксантогенат-SDS (XS) протокол на Tillet & Neilan (2000) или протеиназа-К. Концентрацията и чистотата на ДНК са измерени с помощта на спектрофотометър NanoDrop 2000 UV-VIS (Thermo Scientific). Екстрахираната ДНК е визуализирана върху агарозен

гел с помощта на етидиев бромид и UV трансилюминация (MiniBis Pro гел документираща система, DNR Bio-Imaging Systems Ltd.).

**Таблица 1.** Цианобактериални щамове от РАСС, използвани в настоящата дисертация при амплифицирането на ОМЕР и неговата валидация

№	Вид	Щам № в РАСС	Произход на щама	
			Изолирал	Местонахождение
1.	<i>Phormidium uncinatum</i>	8693	МЛАДЕНОВ	р. Велека, България
2.	<i>Microcoleus autumnalis</i> ( <i>Phormidium autumnale</i> )	5527	CLASEN	Германия
3.	<i>Phormidesmis molle</i> ( <i>Phormidium molle</i> )	8140	ВОДЕНИЧАРОВ	Блато, гр. Пещера България
4.	<i>Pseudanabaena galeata</i>	5411	RIESE	Германия
5.	<i>Tolypothrix tenuis</i>	5497	SCHWABE	Германия
6.	<i>Anabaena bornetiana</i>	8775	МЛАДЕНОВ	гр. Пловдив, България
7.	<i>Nostoc linckia</i>	5085	HEGEWALD	Унгария
8.	<i>Nostoc punctiforme</i>	8646	АНГЕЛИЕВА	гр. Пловдив България

#### 4.1.3. Амплификация и секвениране на външен мембранен ефлукс протеин (Outer Membrane Efflux Protein, ОМЕР)

За амплифициране на ОМЕР-региона са използвани праймерите ОМЕР-R (5'-ТСТССГГСТГААТСТСАГГА-3') и ОМЕР-F (5'-АГГААГАТТГСТСА САГССС-3'), Дизайнът на праймерите е направен с помощта на опцията Primer-BLAST на NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). За провеждане на PCR-реакцията е използван кит PuRe-Taq™ ReadyToGo Beads (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), включващ 1.5 U Taq ДНК полимераза, 10 mM Tris-HCl pH 9, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 μM dNTP. Към микса за всяка реакция са добавени 10 pmol от двата праймера, 100 ng геномна ДНК и DEPC-вода до краен обем 25 μl. Амплификацията е проведена в TC-412 thermocycler (Techne, Cambridge Ltd., UK) при следната програма: – предварително денатуриране на ДНК за 5 min при 94°C, последвано от 30 цикъла 60 s при 95°C, 60 s при 53°C (хибридизация) и 1 min при 72°C (елонгация). Реакцията завършва с елонгираща стъпка от 2 min при 72°C; Получените PCR-продукти са анализирани чрез електрофореза в 1.5% агарозен гел в 1x Трис-Ацетат-ЕДТА буфер (ТАЕ). Като позиционен маркер е използван GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas Life Sciences). Гелове са визуализирани с етидиев бромид и UV светлина. След визуализацията коректните PCR-



продукти са изрязани от гела, а изолираната ДНК е пречистена с помощта на DNA Extraction Kit (Fermentas Life Sciences). Пречистените продукти са изпратени за секвениране (MWG Eurofins Operon, Ebersberg, Германия). При секвенирането са използвани същите праймери, като тези при амплификацията.

#### 4.1.4. Филогенетичен анализ на база OMEP, Psb27 и 16S рРНК

След внимателно оценяване на наличните цианобактериални геноми в NCBI базата данни (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) са подбрани няколко протеини, които могат да послужат, като молекулярни маркери за проучване на цианобактериалната филогения.

Филогенетичните анализи са извършени чрез използване на аминокиселинните секвенции за OMEP от 82 цианобактериални вида/щама с напълно секвенирани геноми. Размерът на анализирания OMEP цианобактериални секвенции варира между 350 и 792 аминокиселини. Множественото сравняване на аминокиселинните секвенции е направено чрез ClustalW програмата от филогенетичния софтуер MEGA 7 (Kumar et al., 2016). Minimum evolution (ME), maximum parsimony (MP), maximum-likelihood (ML), и neighbor-joining (NJ) филогенетичните дървета са конструирани използвайки MEGA 7 (Kumar et al., 2016). Всички алгоритми са изпълнени с 1000 bootstrap повторения. Всички позиции, съдържащи липсващи бази и липсващи данни бяха премахнати от набора данни чрез опцията “complete deletion“. Еволюционните дистанции са изчислени използвайки метода Maximum Composite Likelihood. ME дърветата са генерирани чрез алгоритъма Close-Neighbor-Interchange (CNI). MP дърветата са конструирани използвайки метода Tree-Bisectional-Reconnection (TBR) с търсене на ниво 1 и случайно добавено дърво. За ML дърветата е използван модела General Time Reversible (GTR) със Corrected Invariable Sites (I), Gamma Distribution Shape Parameters (G), и Nearest-Neighbor-Interchange алгоритъм.

В допълнение са направени филогенетични анализи на базата на 16S рРНК секвенции от същите 82 цианобактериални вида/щама. Анализите са извършени по същият начин описан по-горе.

Номерата за достъп на всички използвани цианобактериални OMEP и 16S рРНК нуклеотидни секвенции са представени във филогенетичните дървета. *Pseudomonas aeruginosa* е използван, като външен таксон за рутиране на дърветата.

При филогенетичните анализи на база Psb27 са използвани 163 цианобактериални вида/щама с напълно секвенирани геноми. Размерът на анализирания Psb27 цианобактериални секвенции варира между 128 и 150 аминокиселини. С цел сравняване на топологията на таксоните, филогенетична реконструкция е направена и с 16S рРНК нуклеотидните секвенции на същите щамове използвани при Psb27-филогенетичното дърво.

Извършените анализи са проведени както за ОМЕР. Като външна група за рутиране на дърветата са използвани съответно *Arabidopsis thaliana* за Psb27 и *Pseudomonas aeruginosa* K2 за 16S рНК секвенциите.

## **4.2. Материали и методи свързани с определяне на качествения и количествен състав на фикобилипротеините на избрани цианобактерии като биохимичен маркер в таксономията на отдел *Cyanobacteria***

### **4.2.1. Цианобактериални култури и условия на култивиране**

В тази част на дисертацията са използвани 14 цианобактериални щама, съхранявани в алгологичната колекция (РАСС) на катедра „Ботаника и Методика на обучението по биология“ при Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“ и 4 щама, закупени от Културната колекция за автотрофни организми (Culture Collection of Autotrophic Organisms – ССАЛА), Требон, Чехия (Таблица 2). За култивиране на изследваните щамове са използвани три вида хранителни среди – Bold’s Basal Medium (BBM), Zehnder Medium (Z) and Blue-Green Medium (BG). Водорасловите щамове са култивирани екстензивно (в продължение на месец) и интензивно (за 14 дни). И при двата вида култивиране са използвани и трите хранителни среди. Екстензивното култивиране е извършено при стайна температура (20 – 25°C) и разсеяна слънчева светлина с трите хранителни среди в два варианта – течна и бифазна.

Щамовете с течна хранителна среда са култивирани в епруветки, а тези на бифазна – в петритата. Интензивното култивиране е проведено в култивационен блок. Всеки изследван щам е култивиран на трите хранителни среди (BBM, Z, BG) в акерманови епруветки.

Режимът на култивиране е подбран така, че да се доближи максимално до условията за развитие на изследваните видове, през летните месеци в природни хабитати: температура 26 – 27°C, фотопериод 15/9 (светло:тъмно), продухване със 100 L въздух на час на литър суспензия. Скоростта на растеж на цианобактериалните култури е определена спектрофотометрично (M107 Visible Spectrophotometer, Spectronic Camspec Ltd., Leeds, UK) чрез измерване на оптичната плътност при 750 nm, както е описано от Lu et al., 2017.

### **4.2.2. Таксономично определяне**

Таксономичната позиция на изследваните щамове е проверена и актуализирана в съответствие с промените в таксономията на цианобактериите настъпили в последните години (Komarek et al., 2014). За морфологичния анализ бе използван стандартен светлинен микроскоп Magnum свързан с дигитална камера. За документиране на морфологичните белези при изследваните щамове са направени микрофотографии.

#### **4.2.3. Обработка на проби, извличане на пигменти (С-РЕ, С-РС, АРС и РЕС)**

За отчитане на пигментното съдържание са използвани цианобактериални проби с мокро тегло от 120–140 mg. Цианобактериалната маса е третирана с течен азот и смиляна в хаванче, за да се разруши напълно клетъчната стена. Екстракцията на пигменти е извършена съгласно Pereira et al., 2014 с леки модификации. Накратко, 2 ml фосфатен буфер (pH = 7) се добавя към пробите и те се центрофугират в микро-центрифуга при 1000 об/мин за 20 минути.

#### **4.2.4. Определяне концентрацията на пигментите**

Получената супернатанта е измерена в спектрофотометър (M107 Visible Spectrophotometer, Spectronic Camspec Ltd. Лийдс, Великобритания) при следната дължина на вълната: 455, 565, 572, 592, 612, 618, 645, 647, 652 и 730 nm. За контрола при измерванията е използван фосфатен буфер. Изчисляването на концентрацията на пигментите се извърши съгласно Kussar & Alberte., 1983 и Kaplan et al., 1986, чрез използване на стойности на абсорбцията, отчетени за различните проби при различна дължина на вълната.

#### **4.2.5. Статистически анализ**

Резултатите са представени като средни стойности  $\pm$  стандартно отклонение (SD) от два отделни експеримента с поне три повторения. Тъй като вероятността за разпределение на фикобилипротеините в анализиранияте щамове не са известни предварително, използвахме непараметрични тестове.

### **4.3. Материали и методи свързани с прилагане принципите на полифазната таксономия за разрешаване таксономичния статус на спорни видове от природна проба от Северен Солник на Атанасовско езеро.**

#### **4.3.1. Описание на изследваният воден басейн**

В настоящата дисертация се изследва малък басейн в северната част на Атанасовско езеро (Северен Солник: N 42°34'16.4"; E 27°28'04.4"). Пунктът се характеризира с променлива соленост и интензивни цъфтежи на пикопланктонни видове. Атанасовско езеро е една от най-значимите влажни зони за гнездене на водолюбивите птици по българското Черноморско крайбрежие. През 1980 г. Северната част на езерото е обявена за резерват, а от 1984 г. и за Влажно място от международно значение според Рамсарската Конвенция.

#### **4.3.2. Техники на събиране на природните проби**

Водните проби за физикохимични анализи са вземани ежегодно 5 пъти през вегетационния сезон (март-октомври). Водните проби за физико-химични анализи са колекционирани пет пъти всяка година (2013, 2014, 2015, 2016 и 2017) през месеците март, юни, юли, септември и октомври. Параметрите рН, електропроводимост, температура и разтворен кислород/насищане с кислород са измервани *in situ* с Multi 3410 SET B TetraCON 952-3 (WTW). Всички биогени са измерени в лабораторни условия на рНotoFlex STD (WTW) в съответствие с международните стандарти (N-NO<sub>2</sub>: EN 26777; N-NO<sub>3</sub>: ISO 7890-1; N-NH<sub>4</sub>: ISO 7150/1; P-PO<sub>4</sub>: EN ISO 6878). Концентрацията на хлорофил-а е определяна по спектрофотометричния метод, в съответствие с БДС ISO 10260:2002. Водите на Северен Солник се класифицират като миксо- до хиперсалинни според Venice System (Anonymous 1958). Пробонабирането за фитопланктон е извършвано три пъти годишно (2013-2017) през летния сезон от юни до септември. Поради малката дълбочина на езерото и липсата на вертикален солеви градиент пробите са колекционирани с бутилка на Meyer от повърхностния слой и са фиксирани с 4% формалдеhid (4% крайна концентрация). За периода на изследване са анализирани 14 фитопланктонни проби.

#### **4.3.3. Изолиране и култивиране на видове на автотрофния пикопланктон (АПП)**

Автотрофните фитопланктонни видове са изолирани чрез нанасяне на щрихи върху петрита с агар от живи природни проби. Тези проби са колекционирани през 2016 г., когато са регистрирани необичайно интензивни „цъфтежи“ на фитопланктона. Щамът РАСС 8945 е изолиран от цъфтежна проба през юни 2016 г. (T = 27°C; S = 30.3‰) и е култивиран върху течна среда с морска вода, модифицирана чрез добавяне на Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH=8,5). Щамът РАСС 8946 е изолиран от цъфтежна проба събрана през юли 2016 г. (T = 27.6°C; S=59‰) и е култивиран върху течна среда с изкуствена морска вода (Eddy 1956). Водорасловите култури се поддържат в лаборатория при стайна температура (22°C ± 2°C) и цикъл 15:9 часа светло: тъмно. Двата алгологично чисти щама (РАСС 8945, РАСС 8946) са депозиранни във Водорасловата колекция на Пловдивския университет (РАСС).

#### **4.3.4. Екстракция на ДНК, PCR амплификация и секвениране на прокариотните видове (16S рДНК)**

Геномната ДНК е екстрахирана от култивираната цианобактериална маса по метода на екстракция с протеиназа-К. Концентрацията на ДНК и нейната чистота са измервени чрез спектрофотометър NanoDrop 2000 UV-Vis (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). Целостта на извлечената ДНК се визуализира върху агарозен гел чрез оцветяване с етидиев бромид и UV светлина (система за документиране на гел MiniBIS

Pro, DNR Bio-Imaging Systems Ltd., Йерусалим, Израел). Изолираната ДНК се използва за PCR амплификация на 16S ДНК. За амплифициране на 16S ДНК се използват праймерите 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') и 1492R (5'-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3'). PCR реакциите са проведени с помощта на PuReTaq™ Ready-To-Go™ PCR бийтс (GE Healthcare, Бъкингхамшир, Великобритания), където крайната смес съдържа 1,5 U Taq ДНК полимераза, 10 mM Tris-HCl pH 9, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 μM от всеки dNTP, 5 pmol от всеки от двата праймера, 100 ng геномна ДНК и вода до краен обем от 25 μl. Амплификацията се извършва в TC-412 термоциклер (Techne, Cambridge Ltd., UK), като се използва следната програма: първоначална денатурация за 5 минути при 94°C, последвана от 30 цикъла от 60 секунди при 95°C, 60 секунди при 53°C, 2 минути при 72°C и краен етап на удължаване от 10 минути при 72°C. Всички PCR продукти се анализират чрез електрофореза в 1,5% агарозен гел в буфер Tris-acetate-EDTA (TAE) с GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus като маркер за размер (Fermentas Life Sciences), оцветени с етидиев бромид и визуализирани под UV светлина. След визуализиране под UV светлина, амплифицираният PCR-продукт се изрязва от гела и се пречиства с помощта на кит за екстракция на ДНК (Fermentas Life Sciences). Пречистеният 16S ДНК PCR-продукт е изпратен за директно секвениране (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Германия). Секвенирането е направено, със същите праймери, използвани за PCR амплификация. Нуклеотидната последователност на гена 16S rRNA, получена при секвенирането, е сравнена с други цианобактериални последователности от базата данни на NCBI, с помощта на BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Получената нуклеотидна последователност е депозирана в GenBank (Национален център за биотехнологична информация, NCBI) под номер MN061337.

#### **4.3.5. Екстракция на ДНК, PCR амплификация и секвениране на еукариотните видове (18S ДНК)**

Доминиращите еукариотни видове се култивират при стерилни условия и се изолира геномна ДНК. Пет милилитра култура от микроводорасли се центрофугира при 14 000 RPM (центрофуга Eppendorf 5 424R) с цел подготовка за изолиране на ДНК. Изолирането на ДНК от щама PACC 8946 става с помощта на QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) в съответствие с изискванията на производителя. Концентрацията и качеството на ДНК се определят спектрофотометрично при дължина на вълната 260 nm, като се използва Epoch четец за микротитърни плаки и протокол T3 плака. Рибозомната ДНК се амплифицира съгласно Yamamoto et al. (2003). Накратко, реакцията се провежда в 50 μl реакционна смес, която съдържа 1x реакционен буфер, 200 μM dNTPs, 0.2 μM 5'-PCR 1-праймер (AC-STGGTTGATCCTGCCAGT), 0.2 μM 3'-PCR 3-праймер (CCTTCYGCAGGTTACACCTAC), 100 ng водораслова геномна ДНК и 1 единица Q5

High Fidelity DNA полимераза (New England Biolabs). Пробите се поставят в термоциклер и се подлагат на 30 PCR цикъла на денатурация при 95°C за 60 s, 66°C за 60 s и удължаване при 72°C за 60 s. Следва стъпка на удължаване при 72°C за 10 минути. PCR ампликонът се отделя върху 0.8% агарозен гел и се пречиства с QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN). Секвенирането е извършено от компанията Microsynth (Швейцария) с помощта на автоматизирани ABI секвенатори. Хроматограмите са коригирани ръчно със софтуера DNA Star (Lasergene, САЩ). Получената нуклеотидна последователност е депозирана в GenBank под номер MN088860. Тридесет и три нуклеотидни последователности с най-голямо сходство с получената секвенция са избрани за по-нататъшен филогенетичен анализ.

#### **4.3.6. Филогенетичен анализ**

Многократното сравняване на нуклеотидните последователности на прокариотните и еукариотните видове / щамове се извърши с помощта на програмата ClustalW, част от филогенетичния софтуер MEGA 7 (Kumar et al., 2016). Филогенетичните дървета са конструирани чрез MEGA 7, с помощта на алгоритмите за ML и NJ. Всички алгоритми са изпълнени с 1000 повторения. Нуклеотидните позиции, съдържащи пропуски и липсващи данни, са елиминирани от набора от данни (пълна опция за изтриване). Щамът *Escherichia coli* str. K-12 (NR102804) е използван във филогенетичния анализ на цианопрокариотите като външен щам според който се ротира дървото. Анализът на еукариотните видове / щамове включва 34 нуклеотидни последователности.

#### **4.3.7. Определяне числеността и биообема на фитопланктона**

Таксономичният състав на нано- и микропланктона е определен със светлинен микроскоп Amplival (увеличение до 1000x). Преброяването на фитопланктона се извърши с помощта на обърнат микроскоп. Биообемът на водораслите се определя по Hillebrand et al., 1999. Отчитането на размера на нано- и микропланктонните видове са извършени за всеки вид на базата на размерите на най-малко десет индивида. Клетъчният биообем на видовете пикопланктон е изчислен чрез измерване на 50 клетки. Общият биообем на фитопланктона е изчислен като сбор от биообемите на всички видове във всяка проба. Относителният биообем на АРР е определен като процент от общия биообем. Приемаме, че АПП (про- и еукариотни членове) е доминиращ, когато има относителен биообем над 50% от общия биообем.

#### **4.3.8. Статистически анализ**

За определяне на емпиричните зависимости между числеността на автотрофния пикопланктон (AbАРР) и общия биообем на фитопланктона (TBVol) е използвана методологията на обобщените адитивни модели



(generalized additive models) Hastie and Tibshirani (1990), and Stasinopolus et al. (2017). Необходимите пресмятания са извършени с пакетите *gam* и *gam-ss*, разработени от тези автори, за програмната среда R (R core team, 2019). Предикторите в GAMs регресионните модели се включват в модела чрез кубични сплайн функции за разлика от обобщените линейни модели (generalized linear models), в които предикторите участват линейно.

## 5. Резултати

### 5.1. Разработване на нови молекулярно генетични маркери

В търсене на нови молекулярно-генетични маркери са проведени биоинформатични анализи с наличните в базите данни пълни цианобактериални геномни секвенции, използвайки софтуерните програми IMG ER, Prodigal, MAFFT и Mesquite. В резултат на тези анализи като кандидати за подходящи молекулярно-генетични маркери са селектирани няколко цианобактериални клетъчни протеини, между които външен мембранен ефлукс протеин (Outer Membrane Efflux Protein, OMEP) и Psb27 – липопротеин, част от фотосистемата II (PSII), локализиран в тилакоидната мембрана на цианобактериите.

#### 5.1.2. Приложение на външен мембранен ефлукс протеин (Outer Membrane Efflux Protein, OMEP) като нов молекулярно-генетичен маркер

Данните за структурата и функциите на OMEP протеините в цианобактериите са много оскъдни. OMEP протеините участват в транспорта както на различни малки молекули, така и на големи протеини и токсини директно от вътрешността на клетката през двете мембрани към екстрацелуларното пространство (Hahn et al., 2012). Доказано е, че те са необходими за образуването на хетероцисти (Moslavac et al., 2007).

На базата на аминокиселинни секвенции за OMEP и прилагайки основните четири метода за филогенетичен анализ (minimum evolution /ME/, maximum parsimony /MP/, maximum-likelihood /ML/ и neighbor-joining /NJ/) са анализирани 82 цианобактериални щамове с напълно секвенирани геноми. Филогенетичното дърво, получено с помощта на ML метода е показано на Фигура 1. Както може да се види от фигурата, повечето цианобактериални видове/щамове принадлежащи към различни родове са групирани в различни клади, подкрепени с високи bootstrap стойности. Пет щамове на *Crocospaera watsonii* са групирани в кладата *Crocospaera watsonii* Clade (Фигура 1, потъмнено), която е подкрепена с bootstrap стойност от 99%. Тази клуда е показана отделно на Фигура 2А. Другите по-големи клади са *Microcystis aeruginosa* Clade и *Prochlorococcus marinus* Clade (Фигура 1, потъмнено). Първата клуда е подкрепена също с 99% bootstrap стойност и съдържа 9 щамове *Microcystis aeruginosa* (Фигура 2В). Втората клуда включва 11 щамове *Prochlorococcus marinus* (66% bootstrap стойност) (Фигура 2С).

Разликата между щамовете, групирани във всяка една от двете кледи е, че те са изолирани от различни географски райони. Един от щамовете на *Prochlorococcus marinus* (MIT 9313) е позициониран в друга група заедно с един щам *Synechococcus sp.* (RS9916) и 3 други щама *Prochlorococcus* (MIT 0701, MIT 0701, MIT 0701). Тази топология е подкрепена съответно от 53% и 99% bootstrap стойности (Фигура 6). Важно е да се отбележи, че всички щамове *Synechococcus* са групирани заедно в една кледи (54% bootstrap стойност). Тази кледи включва също и един щам от *Prochlorococcus marinus* (MIT 9303), въпреки че bootstrap стойността не е значима.

Другите цианобактериални видове/щамове (с малко изключения) са също групирани според тяхната таксономична принадлежност към съответния род. Например *Stanieria* (99% bootstrap), *Leptolyngbya* (98% bootstrap), *Fischerella* (99% bootstrap), *Calothrix* (99% bootstrap), *Pseudanabaena* (96% bootstrap), *Arthrospira* (96% bootstrap). Четири щама *Cyanothece* са групирани в две отделни кледи с bootstrap стойност от 99% и 78%. Видовете от тези две кледи имат различно географско разпространение. Някои от цианобактериалните видове, които принадлежат към различни родове са групирани заедно. Тази топология се поддържа от висока bootstrap стойност (99%): *Microcoleus vaginatus* FGP-2 и *Oscillatoria nigro-viridis* PCC 7112, *Nostoc sp.* PCC 7107 и *Tolypothrix sp.* PCC 760, *Cylindrospermopsis raciborskii* CS-505 и *Raphidiopsis brookii* D9, *Anabaena variabilis* ATCC 29413 и *Nostoc sp.* NIES-3756. Възможно е някои от тези щамове да са погрешно идентифицирани на базата на тяхната морфология.

За *Cylindrospermopsis raciborskii* CS-505 и *Raphidiopsis brookii* D9 е доказано, че тези два вида имат различна морфология, различно географско разпространение (Австралия и Бразилия), произвеждат различни цианотоксини, но имат много подобни геноми и образуват монофилетична група (Stucken et al., 2010). Обяснението е, че техните геноми са много малки (3.9 Mb за *Cylindrospermopsis raciborskii* CS-505 и 3.2 Mb за *Raphidiopsis brookii* D9) в сравнение с други нишковидни видове и вероятно способността на *Raphidiopsis brookii* D9 да формира същински хетероцисти е вторично загубена заедно със способността за N<sub>2</sub>-фиксация (Stucken et al., 2010).

Използвайки neighbor-joining (NJ) метода за филогенетичен анализ, базиран на същите ОМЕР секвенции, се получи сходни резултати. Сходни са и филогенетичните дървета, получени чрез методите minimum evolution (ME) (Фигура 10) и maximum parsimony (MP). Тъй като секвенцията за 16S рРНК е най-често използвания молекулярен маркер за изясняване на цианобактериалната филогения и таксономична класификация на щамове с неизяснен статус, конструирахме филогенетични дървета, базирани на 16S рРНК секвенции, получени от същите цианобактериални геноми, използвани за ОМЕР филогенетичните анализи, прилагайки същите методи.

На Фигура 3 е показано ML филогенетичното дърво базирано на 16S рРНК секвенции за анализираниите цианобактериални видове/щамове. Тъй като филогенетичните дървета, получени при прилагане на другите методи (ME, MP, NJ) показват подобно групиране, те не са представени. Подобно на дърветата, получени на базата на OMEP секвенции, представителите на родовете *Synechococcus* и *Prochlorococcus* формират големи сестрински клади, но с много ниски bootstrap стойности (Фигура 3).

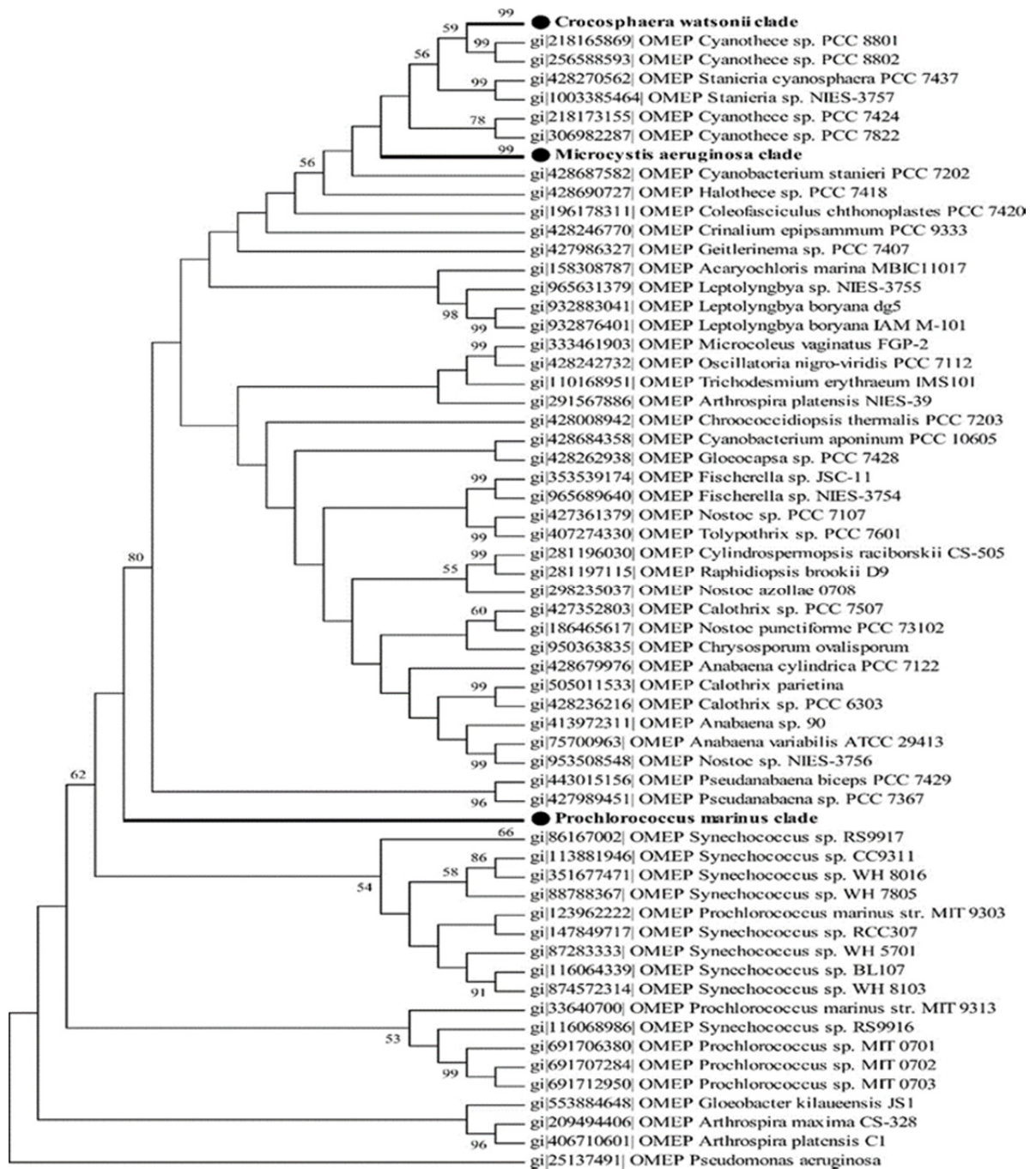
За разлика от филогенетичните дървета, генерирани от OMEP секвенциите, тук кладите *Microcystis aeruginosa* и *Crocospaera watsonii* не са позиционирани в отделни клонове (Фигура 3). Те са смесени с други цианобактериални видове. Другите клади включват различни цианобактериални видове с ниски стойности на статистическа подкрепа. Сравнявайки двете филогенетични реконструкции на база OMEP с филогенетичното дърво, генерирано на база 16S е ясно, че OMEP е по-подходящ маркер за изясняване на филогенетичните връзки при цианобактериите на родово и видово ниво, отколкото консервативните 16S рРНК генни секвенции.

### **5.1.3. Приложение на Psb27 – липопротеин, част от фотосистемата II (PSII), като нов молекулярно-генетичен маркер**

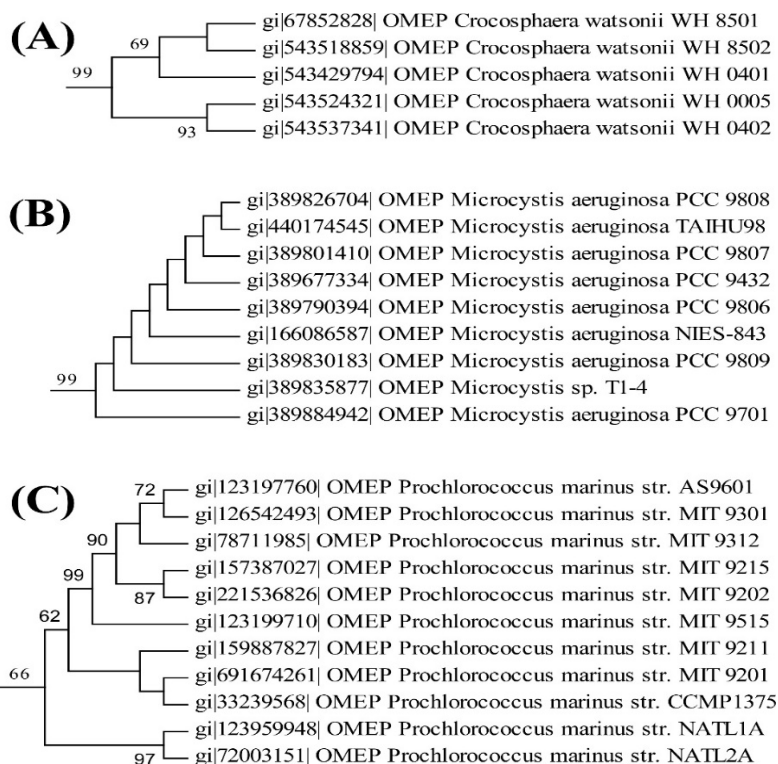
Протеинът Psb27 досега не е използван за филогенетични анализи на цианобактерии. Фотосистема II (PSII) е първият компонент на фотосинтезичната електронно-трансферна верига, разположен в тилакоидните мембрани на цианобактерии, водорасли и растения. Един от най-добре изследваните протеини, участващи в биогенезата на PSII, е спомагателният фактор Psb27, който е част от няколко различни междинни съединения на PSII и играе роля както в биогенезата на PSII, така и във възстановяването. Psb27 е малък протеин (при цианобактериите – 11 kDa), разположен единствено от страна на лумена в почти нееволуиращата кислород-мономерна фотосистема II (PSII). Psb27 е от съществено значение за оцеляването на цианобактериалните клетки, отглеждани при стресови условия (Mabbitt et al., 2014).

В това проучване са изследвани филогенетичните взаимоотношения на цианобактериални щамове въз основа на протеиновите последователности на Psb27. Филогенетичното положение на цианобактериалните щамове е сравнено с филогенетично дърво реконструирано на базата на 16S рДНК. Конструираниите филогенетични дървета, базирани на различни методи, показват висока степен на сходство с малки топологични разлики. В дисертцията са представени само ML дърветата. Топологията на реконструираното дърво, базирано на протеиновите последователности на Psb27, показва, че повечето цианобактериални видове/щамове, принадлежащи към един род, са групирани заедно и са подкрепени с високи bootstrap стойности. Всичките петнадесет представители на род *Prochlorococcus* са групирани заедно с 98% подкрепа (Фигура 4, клада *Prochlorococcus*). Кладата *Prochlorococcus* включва девет *Prochlorococcus marinus* и шест

*Prochlorococcus* sp. щамове, които се групират в три подгрупи. Един щам от *Prochlorococcus* sp. (MIT 1303) е групиран заедно с щамове *Prochlorococcus marinus*, но с много ниска bootstrap стойност (6%). Представители на *Synechococcus* (23 щама) се разполагат в две отделни клади (Фигура 4, *Synechococcus* clade 1, *Synechococcus* clade 2). Тази топология се поддържа от висока bootstrap стойност (99%). Други основни клади представени на Фигура 4 са клата *Microcystis aeruginosa*, която включва 9 щама и има 100% bootstrap стойност; клата *Crocospaera watsonii* (6 щама, 100% bootstrap стойност); клата *Planktothrix* (8 щама, 99% bootstrap стойност) и клата *Fischerella* (7 щама, 90% bootstrap стойност). Щамове от род *Nostoc* се групират в две отделни клади: *Nostoc* clade 1 (5 щама, 97% поддръжка, Фигура 4) и *Nostoc* clade 2 (11 щама, 83% поддръжка, Фигура 4). Щамове от род *Calothrix* също се групират в две отделни клади: *Calothrix* clade 1 (4 щама, 91% поддръжка) и *Calothrix* clade 2 (5 щама, с 72% поддръжка на топологията Фигура 4). Повечето членове на род *Phormidium* са групирани в кладата *Phormidium* (6 щама, 95% bootstrap стойност, Фигура 4). Има и други два вида *Phormidium* (*Phormidium ambiguum* и *Phormidium ambiguum* IAM M-71), които се групират заедно с щамове от разред *Oscillatoriales*. Другите цианобактериални видове, отнасящи се към определени родове, са групирани в по-малки отделни групи: клата *Geminocystis* (2 щама, 99% bootstrap стойност); клата *Moorea* (3 щама, 100% bootstrap support); клата *Limnothrix* (2 щама, 100% bootstrap стойност); клата *Thermosynechococcus* (3 щама, 100% bootstrap стойност); клата *Scytonema* (3 щама, 92% bootstrap стойност); клата *Trichormus* (2 щама, 99% bootstrap стойност); клата *Cylindrospermopsis* (3 щама, 100% bootstrap стойност); клата *Nodularia* (2 щама, 95% bootstrap стойност) (Фиг. 4). С цел сравнение между новопредложения маркер *Psb27* и утвърденият в цианобактериалната таксономия -16S rDNA, конструирахме и филогенетично дърво, базирано на 16S rDNA генни последователности за същите цианобактериални щамове, използвани при генериране на *Psb27* дървета, и прилагайки отново алгоритмите ML, MP, ME и NJ. На Фигура 5 е показано ML филогенетичното дърво базирано на 16S рНК секвенции за анализиранияте цианобактериални видове/щамове. Тъй като филогенетичните дървета, получени при прилагане на другите методи (ME, MP, NJ) показват подобно групиране, те не са представени. Сравнението на филогенетичното дърво на базата на 16S рДНК с това на базата на *Psb27* показва интересни топологии. Повечето от видовете, които са монофилетични и имат висока статистическа подкрепа в дървото реконструирано на база *Psb27*, не се групират заедно в 16S дървото. Например *Planktothrix*, *Fischerella*, *Microcystis aeruginosa* и *Crocospaera watsonii* (Фиг. 5).



**Фигура 1.** Филогенетичен анализ, проведен на базата на ОМЕР аминокиселинни секвенции чрез прилагането на метода Maximum-Likelihood (ML) и еволюционния модел GTR+I+G. Числата показват bootstrap поддръжката (> 50%) от 1000 повторения. За рутване на дървото като външна група е използвана ОМЕР секвенцията за *Pseudomonas aeruginosa*. Номерата за достъп в GenBank са дадени преди името на вида. Анализът включва 83 аминокиселинни секвенции

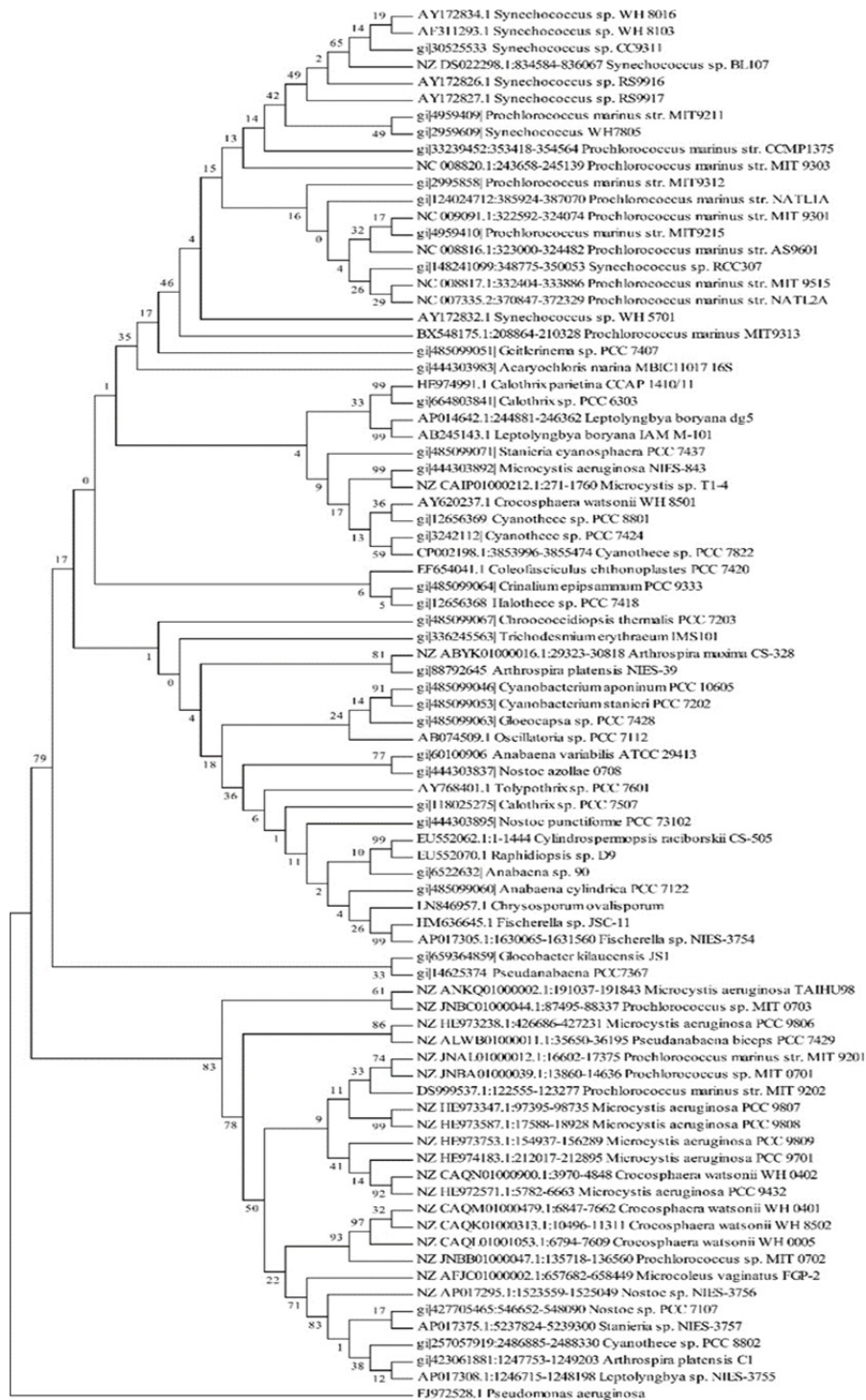


**Фигура 2.** Експортирани поддървета от основното филогенетично дърво, получено чрез **Maximum-Likelihood (ML)** анализ на базата на OMEP аминокиселинни секвенции (Фигура 8). **(A)** – *Crocosphaera watsonii* clade; **(B)** – *Microcystis aeruginosa* clade; **(C)** – *Prochlorococcus marinus*

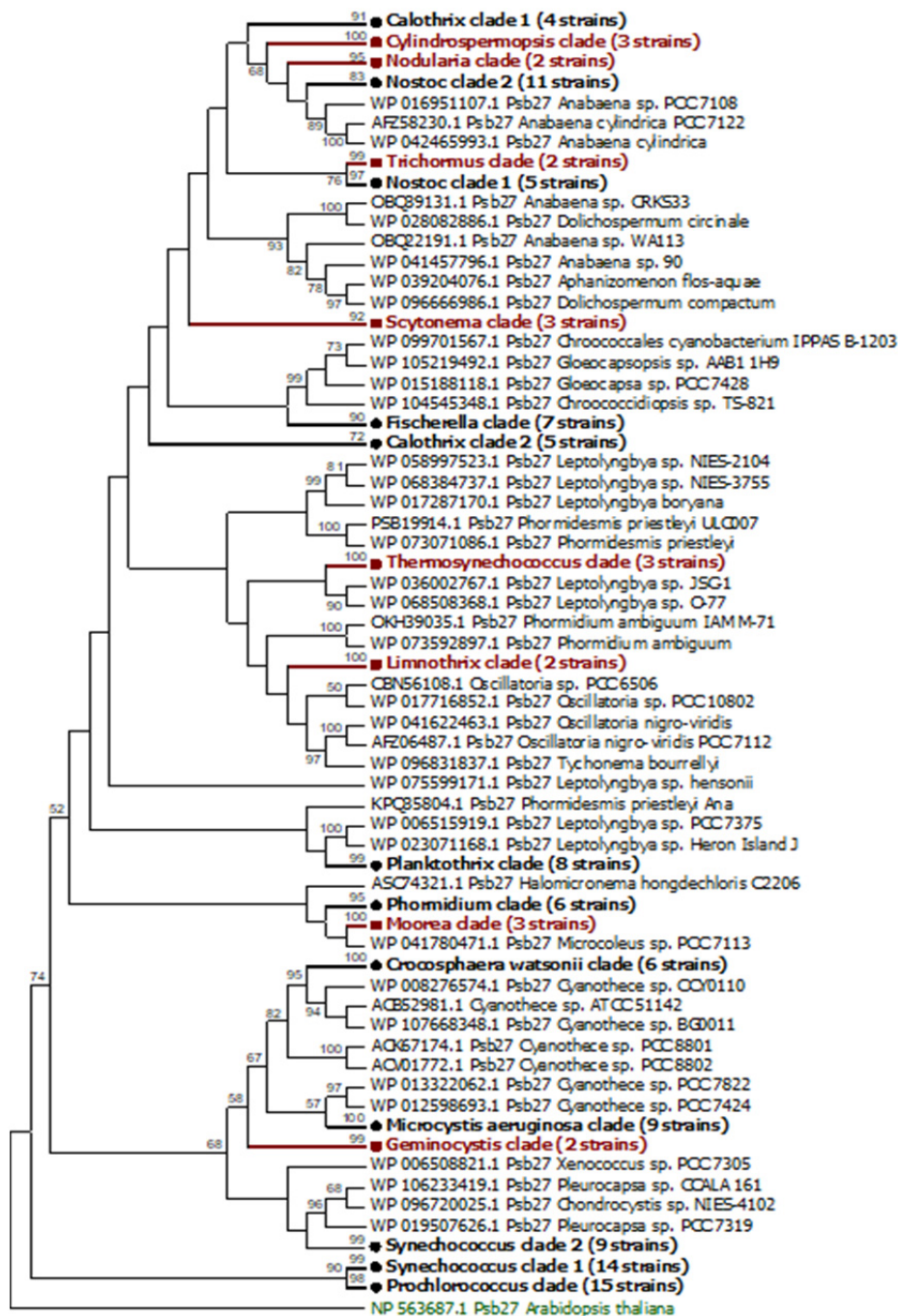
Някои от другите цианобактериални видове също са групирани в по-малки отделни клади, както във филогенетичното дърво, базирано на Psb27, но с ниски bootstrap стойности: клата *Thermosynechococcus* (2 щамове, 48% bootstrap стойност); клата *Geminocystis* (2 щамове, 19% bootstrap стойност); клата *Moorea* (3 щамове, 48% bootstrap стойност); клата *Limnothrix* (2 щамове, 89% bootstrap стойност) (Фиг. 5).

Разглежданите в настоящата дисертация еволюционни връзки между 163 цианобактериални вида/щамове, обхващащи разнообразни таксони, базирани на Psb27 протеинови последователности. Резултатите показват, че филогенетичното групиране в повечето случаи поддържа морфологичните характеристики. Освен това, генерираното Psb27 дърво показва, че цианобактериалните видове/щамове образуват няколко монофилетични групи. Анализите демонстрират, че Psb27 последователностите решават филогенетичните позиции на тясно свързани щамове много по-добре от 16S рДНК последователностите. Предлагаме нов молекулярен маркер, който може да се използва в комбинация с други за подобряване на филогенетичните реконструкции в цианобактериите на родово и подродово ниво.

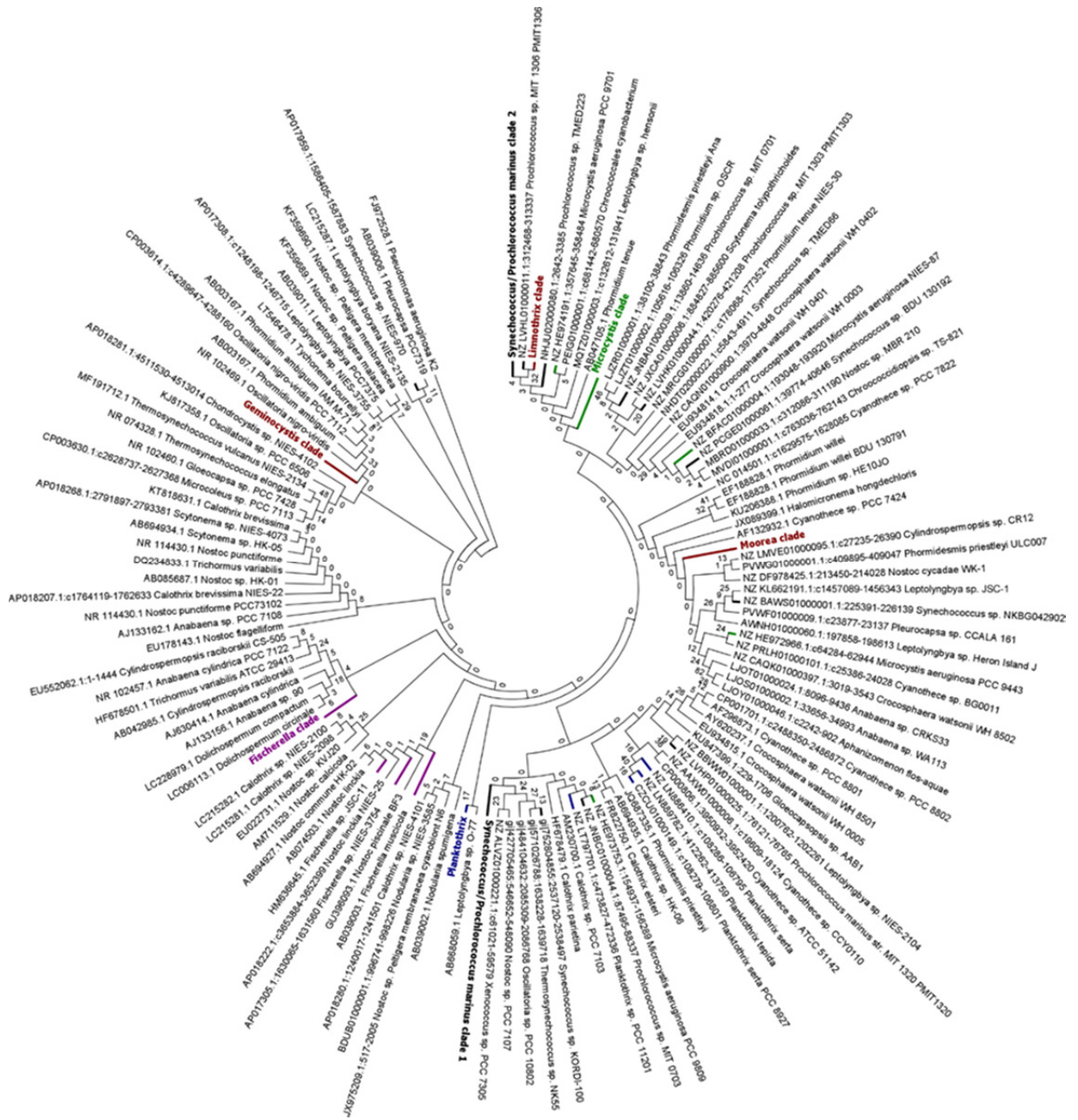




**Фигура 3. Maximum-Likelihood (ML) филогенетично дърво конструирано на базата на 16S rRNA генни секвенции. Дървото е генерирано чрез прилагане на еволюционния модел GTR+I+G. Анализът включва 83 нуклеотидни секвенции за същите видове/щамове както на Фигура 6**



**Фигура 4.** Филогенетично дърво базирано на Psb27 аминокиселинни секвенции на 163 цианобактериални щама. Реконструкцията е извършена чрез използване на ML анализ, прилагайки GTR + I + G еволюционен модел. Цифрите над клоновете показват bootstrap поддръжката (> 50%) от 1000 повторения. *Arabidopsis thaliana* се използва като аутгрупа. ● – големи монофилетични кледи; ■ – малки монофилетични кледи

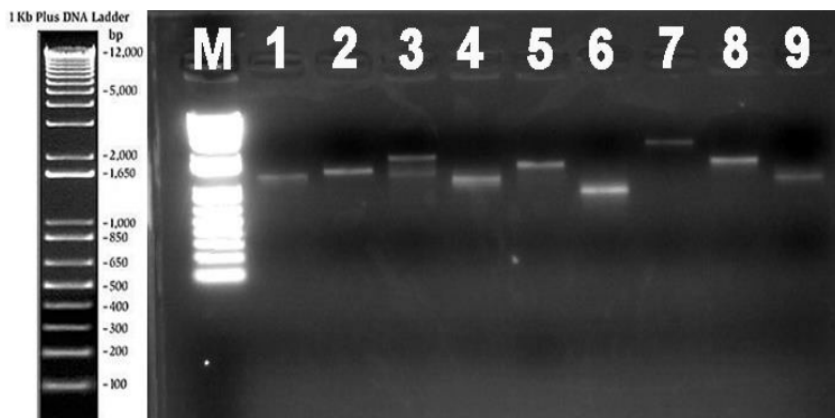


**Фигура 5.** Филогенетично дърво базирано на 16S rDNA секвенции от 163 цианобактериални щамове. Дървото е реконструирано при използване на ML анализ и GTR+I+G еволюционен модел. 16S rDNA секвенцията на *Pseudomonas aeruginosa* K2 е използвана като аутгрупа. Цифрите над клоновете показват bootstrap поддръжката от 1000 повторения

Бъдещата валидация на новия генетичен маркер би довела до обогатяване на генетичната информация за този протеин, което ще разшири обхвата на анализите.

#### 5.1.4. Практическо валидиране на новопредложените молекулярно-генетични маркери чрез използване на цианобактериални щамове от РАСС

За да се тества приложимостта на селектираните нови молекулярно-генетични маркери са направени специфични PCR праймери за амплификация на генните участъци, кодиращи ОМЕР. За целта е изолирана ДНК от няколко цианопрокаротиотни щамове, принадлежащи към различни родове на отдела. Използваните цианобактериални щамове са от водорасловата колекцията на Пловдивски университет (РАСС). При условията, описани в раздел „Материали и методи“, са амплифицирани изследваните участъци. Проведена е гел-електрофореза с цел визуализиране на PCR-продукта. Резултатите са показани на Фигура 6. От фигурата се вижда, че маркерите работят и могат успешно да се използват за подобни анализи. Дължината на амплифицирания участък за ОМЕР е около 1200-1600 bp и варира според родовата принадлежност.



**Фигура 6.** Амплифицирани ОМЕР PCR-продукти визуализирани с етидиев бромид в 1.5% агарозен гел

**ОМЕР PCR-продукт:** М – маркер, 1 – *Phormidesmis molle* РАСС 8140, 2 – *Tolypothrix tenuis* РАСС 5497, 3 – *Phormidium uncinatum* РАСС 8693, 4 – *Phormidium autumnale* РАСС 5527, 5 – *Anabaena bornetiana* РАСС 8775, 6 – *Nostoc linckia* РАСС 5085, 7 – *Pseudanabaena galeata* РАСС 5411, 8 – *Nostoc punctiforme* РАСС 8646, 9 – *Phormidium autumnale* РАСС 5527.

За провеждането на по-задълбочени филогенетични анализи на базата на новопредложените маркери е необходимо да има достатъчен брой секвенции за тези протеини (ОМЕР и Psb27) в базите данни. За съжаление, на този етап такива секвенции могат да бъдат взети само за цианобактериалните щамове, чиито геноми са напълно секвенирани. Другата възможност е в бъдеще да се секвенират специфично тези участъци от генома, както се прави за останалите маркери, които се използват за филогенетични анализи.



## **5.2. Качествен и количествен анализ на съдържанието на фикобилипротеини (PE, PC, APC, PEC) и приложението им като биохимичен маркер при таксономията на отдел *Cyanobacteria*.**

Цианобактериите са потенциален източник на фикобилипротеини, който е все още слабо проучен. Един от водещите биохимични маркери в таксономията и в частност в тази на цианобактериите е пигментния състав и съдържание. Затова като допълнение към молекулярно-генетичените анализи в хода на дисертацията се проучи качествения и количествения състав на основните антенни пигменти фикоеритрини (PE), фикоцианини (PC), алофикоцианини (APC) и фикоеритроцианини (PEC) при 18 цианобактериални щамове – 14 щамове от PACC и 4 щамове от CCALA и тяхното приложение като биохимичен таксономичен маркер (Таблица 2). Включените в изследването щамове принадлежат към 3 разряда, 6 семейства и 10 рода.

По литературни данни пречистените фикобилипротеини имат антиоксидантен, антиканцерогенен, антивъзпалителен, имуномодулиращ, хепато-, нефро- и невропротективен ефект. Наред с това, те са и стабилен биохимичен маркер, с потенциал за приложение в таксономията на отдел *Cyanobacteria*. В изследване, проведено в рамките на настоящия дисертационен труд се демонстрира приложимостта на цианобактериалните щамове като източник на фикобилипротеини за целите на биотехнологията, фармацията и медицината от една страна, и приложението им като биохимичен таксономичен маркер от друга. Данните получени в хода на изследването ни позволяват да заключим дали съдържанието и съставът на тези пигменти могат да помогнат за решаването на таксономични казуси сред групата.

Производството на фикобилипротеини от повечето цианобактериални щамове, участващи в настоящото проучване, досега не е било обект на други научни интереси. Установено е, че съдържанието на PE, PC и APC зависи от таксономично положение и условията на култивиране.

Предвид това, в настоящото проучване са варирани методите за култивиране (екстензивно/интензивно), хранителната среда (Z, BG11 и BBM) и нейното рН (рН = 8,5, 9 и 10).

**Таблица 2.** Количество (в  $\mu\text{g/ml}$ ) фикоеритрин (PE), фикоцианин (PC), алофикоцианин (APC) и фикоеритроцианин (PEC) в изследваните цианобактериални щамове. Таксономична позиция на цианобактериалните щамове

Щам №	Таксон	PE $\mu\text{g/ml}$	PC $\mu\text{g/ml}$	PEC $\mu\text{g/ml}$	APC $\mu\text{g/ml}$	Таксономична позиция на цианобак- териалните щамове
PACC 8167	<i>Oscillatoria sp.</i>	105,09	32,53	0,225	54,81	<b>Oscillatoriales</b> Oscillatoriaceae Oscillatoria
PACC 5505	<i>Microcoleus autumnalis</i>	9,36	29,28	0,250	49,85	<b>Oscillatoriales</b> Microcoleaceae Microcoleus
PACC 5511	<i>Microcoleus autumnalis</i>	105,72	23,34	0,233	43,76	
PACC 5517	<i>Microcoleus autumnalis</i>	82,21	27,94	0,194	45,97	
PACC 5522	<i>Microcoleus autumnalis</i>	31,12	51,36	0,286	101,82	
PACC 5527	<i>Microcoleus autumnalis</i>	135,7	35,02	0,333	54,03	
CCALA 843	<i>Wilmottia murayi</i>	13	32	0,016	15	<b>Oscillatoriales</b> Coleofasciculaceae Genus Wilmottiya
PACC 5088	<i>Phormidesmis molle</i>	72,31	33,01	0,121	46,53	<b>Synechococcales</b> Leptplyngbyaceae Phormidesmis
PACC 8140	<i>Phormidesmis molle</i>	72,94	19,34	0,104	37,39	
PACC 8602	<i>Nodosilinea bijugata</i>	77,33	21	0,119	37,7	<b>Synechococcales</b> Leptplyngbyaceae Nodosilinea
CCALA 084	<i>Leptolyngbya boryana</i>	7	264	0,013	171	<b>Synechococcales</b> Leptolyngbyaceae Leptolyngbya
CCALA 078	<i>Leptolyngbya boryana</i>	12,3	55	0,050	44	
PACC 8632	<i>Anabaena sp.</i>	68,56	24,71	0,107	25,41	<b>Nostocales</b> Nostocaceae Anabaena
PACC 8646	<i>Nostoc punctiforme</i>	34,82	11,56	0,069	20,42	<b>Nostocales</b> Nostocaceae Nostoc
PACC 5085	<i>Nostoc linckia</i>	17,93	8,76	0,074	8,47	
PACC 8205	<i>Nostoc sp.</i>	33,59	12,23	0,069	16,89	
CCALA 125	<i>Desmonostoc muscorum</i>	28	16	0,249	13	<b>Nostocales</b> Nostocaceae Desmonostoc
PACC 8754	<i>Calothrix elenkinii</i>	47,41	16,22	0,112	19,45	<b>Nostocales</b> Rivulariaceae Calothrix



Оптималните условия за продукция на фикобилипротеини при изследваните щамове са: екстензивно отглеждане, течна Z-среда и рН = 8,5.

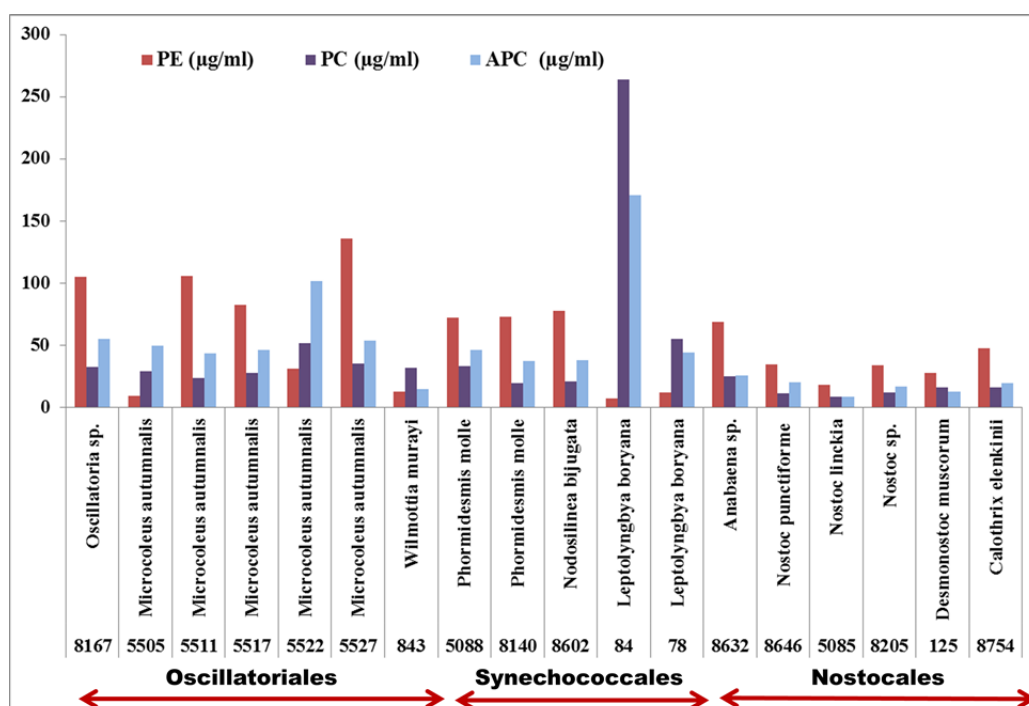
Извлечените в хода на експеримента цианобактериални пигменти и тяхното количество са представени на Фигура 7 и Таблица 2. В петнадесет от осемнадесетте изследвани цианобактериални щамове е установено, че концентрацията на алофикоцианин е по-висока в сравнение с фикоцианина. Изключение е *Wilmottia murayi*, където производството на фикоцианин е два пъти по-високо от това на алофикоцианин. Друго изключение е открито в два щамове на *Leptolyngbya boryana*, където един от тях (*Leptolyngbya boryana* ССАЛА 084) произвежда значително количество от двата пигмента РС и АРС (съответно 0,264 и 0,171 mg/ml) и показва значителен потенциал за използване в биотехнологичното производство. *Microcoleus autumnalis* РАСС 5522 също произвежда фикоцианин и алофикоцианин във високи концентрации (съответно 0,051 и 0,102 mg/ml). Графиката, представяща количеството алофикоцианин, произведен от щамове, следва профила на диаграмата, която показва количественото съдържание на фикоцианин (Фиг. 7). Във всички щамове Nostocales (Таблица 2) количеството фикоеритрин доминира над количествата фикоцианин и алофикоцианин. Например, щамът *Anabaena* sp. РАСС 8632 произвежда РЕ в концентрация от 0,069 mg/ml, а тези от рода *Nostoc* между 0,018 и 0,035 mg/mL (Фиг. 7). В същото време, производство на РС и АРС от *Anabaena* sp. РАСС 8632 е 0,024 и 0,025 mg/mL, а за *Nostoc* видовете между 0,008–0,012 mg/ml РС и 0,008–0,020 mg/ml АРС (Фиг. 7).

В проучването разред Synecococcales е представен от 5 щамове, които принадлежат към три рода – *Phormidesmis*, *Nodosilinea* и *Leptolyngbya* (Таблица 2). Щамове *Phormidesmis* и *Nodosilinea* произвеждат подобно количество пигменти с преобладаване на фикоеритрин и показват много сходни профили по отношение на количеството произведени пигменти (Фигура 7). Щамове *Leptolyngbya*, които принадлежат към един и същи вид – *Leptolyngbya boryana*, показват значителни разлики в количеството произведени фикобилипротеини. Въпреки вариациите, профилът на двата щамове *Leptolyngbya boryana* е сходен, вероятно поради общото таксономично положение. От другата страна, разликата в продукцията на фикобилипротеини от двата щамове *Leptolyngbya boryana* е причина да заключим, че производството на фикоеритрин, фикоцианин, алофикоцианин и фикоеритроцианин в случая е строго индивидуално и най-вероятно е свързано с характеристиките на всеки цианобактериален щам.

Щамове от разред Oscillatoriales, включени в проучването, принадлежат към родовете *Oscillatoria*, *Microcoleus* и *Wilmottia* (Таблица 2). Интересно е, че вариациите в количественото разпределение на четирите пигмента се наблюдават не само сред представителите на различни родове, но и в рамките на един вид. Показателни в случая са резултатите от производството на пигменти на род *Microcoleus*. Всички щамове *Microcoleus autumnalis* (РАСС 5505, РАСС 5511, РАСС 5517, РАСС 5522 и РАСС 5527)

се характеризират с общ профил на производство на фикобилипротеини, както количествено, така и качествено. Данните показват, че четирите щама *Microcoleus autumnalis* (РАСС 5505, РАСС 5511, РАСС 5522 и РАСС 5527) имат голям потенциал за производство на фикоеритрин (0,132, 0,106, 0,201 и 0,136 mg / ml), а два от тях – *Microcoleus autumnalis* (РАСС 5522 и РАСС 5527) са сред най-добрите продуценти на фикоеритроцианин (0,0286 mg/ml и 0,0333 mg / ml). (Фигура 7, Таблица 2). Обикновено представителите на разред Oscillatoriales (род Oscillatoria, род Microcoleus) произвеждат по-голямо количество фикобилиопротеини, отколкото цианобактериите принадлежащи към разредите Synechococcales и Nostocales. Род Microcoleus, както и някои щамове (*Leptolyngbya boryana* ССАА 084 и *Microcoleus autumnalis* РАСС 5522) показват специфичност при производството на фикополипротеини.

Биохимичните характеристики, в това число съдържанието на пигменти, се считат за стабилни и подходящи за таксономията и класификацията на цианобактериите (Komarek, 2005). Ето защо данните получени в настоящото изследване, показващи корелация между количеството произведени фикобилиопротеини и таксономичните позиции на ниво разред и род биха могли да служат като допълнителен таксономичен критерий при решаване на спорни ситуации с участието на тези щамове (Фиг. 7).



**Фигура 7. Връзка количество пигменти – таксономия.** Количество алофикоцианин (АРС), фикоцианн (РС), фикоеритрин (РЕ) и фикоеритроцианин (РЕС) в цианобактериалните щамове включени в изследването. Цианобактериите са култивирани екстензивно в течна Z – среда (pH = 8.5), при стайна температура (20-25°C) и разсеяна слънчева светлина

Необходими са обаче бъдещи изследвания, свързани с оптимизиране на условията на култивиране и продукцията на фикобилипротеини, както и възможността за тяхното масово култивиране и експлоатация.

### **5.3. Приложение на полифазната таксономия за разрешаване таксономичния статус на спорни видове от природна проба от Северен Солник на Атанасовско езеро**

В природна проба от Северен Солник на Атанасовското езеро, взета през юни 2017 г. при висока соленост (53‰), се установи смес от пикопланктонни видове в цъфтежни концентрации. Тяхното таксономично разграничаване по класическия морфологичен начин бе трудно, поради изключително малките им размери. Това ни накара да потърсим допълнителни начини за идентификация на тези видове, прилагайки подхода на полифазната таксономия. Интересът ни бе провокиран и от отчетените във водната проба цианотоксини от групата на микроцистините. Доминиращите в природната проба видове бяха изведени в култура и след натрупване на необходимата биомаса от тях бе изолирана геномна ДНК и проведен молекулярно-генетичен анализ.

В хода на работата са изследвани таксономичния състав, дългосрочната динамика и абиотичните фактори, влияещи на автотрофния пикопланктон (АПП) в Северен Солник на крайбрежната лагуна Атанасовското езеро. Атанасовското езеро е крайбрежна лагуна, използвана за добив на сол в продължение на много години. Неговата соленост варира в широки граници (от 6,3 до > 72‰). Въпреки тези екстремни условия често се наблюдава цъфтеж на фитопланктон. Видовете АПП са идентифицирани чрез използване на полифазен подход, основан на молекулярни и филогенетични анализи на 16S/18S рДНК в комбинация с цитоморфологична и екологична характеристика. *Picochlorum oklahomense* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) и морски вид *Synechococcus* sp. (Synechococcales, Cyanobacteria) са доминиращите генотипове в рамките на АПП. Относителният биообем на АПП към общия фитопланктон е много променлив (от 36 до 99%), тъй като солеността и температурата са основни абиотични двигатели на неговата динамика. Солеността между 30-59‰ и средната лятна температура над 24° С осигуряват екологичен оптимум за развитието на АПП при относителен биообем от 93%.

Това е първото съобщение на съобществото *Picochlorum oklahomense*/*Synechococcus* sp. в състава на АПП в европейска крайбрежна лагуна. Считаме, че механизма на разселване на тези пикопланктонни видове е свързан с водоплаващите птици и те могат да бъдат установени в повече хабитати с обилие на водоплаващи птици или по протежение на миграционните им пътища.

### 5.3.1. Условия на околната среда и трофичен статус

За лагуната са характерни високи летни температури, като средните стойности варират от 19.2 до 24.2°C (Таблица 3). През последните четири години (2014 – 2017) се отбелязва повишаване на средносезонната температура с 5°C. Водите на Северен Солник са алкални, като рН варира от 8,6 до 9,1. През летният сезон се наблюдава насищане с кислород, което достига > 200% (юни 2016 г.), като следствие на интензивните цъфтежи на АПП. За Северен Солник са характерни трайно завишени нива на биогените. Водите са натоварени с N–NH<sub>4</sub>, който в средата на лятото достига най-високи стойности и често е над обхвата за определяне – >1.5 mg L<sup>-1</sup>. Стойностите на N–NO<sub>2</sub> се повишават от пролетта към есента, докато окислената форма N–NO<sub>3</sub> е обикновено под лимита на детекция. Нивата на P–PO<sub>4</sub> са високи и свидетелстват, че няма P-лимитиране на фитопланктона.

**Таблица 3.** Условия на околната среда и хлорофил-а през 2013 – 2017.

Легенда: Температура (T), разтворен кислород (DO), насищане с кислород (OS), проводимост (C), соленост (S), соленост (S), хлорофил-а (Chl-a), н.а. – данни не са представени

Година		Параметри										
		T, °C	pH	DO, mg L <sup>-1</sup>	OS, %	C, mS cm <sup>-1</sup>	S, ‰	N-NO <sub>2</sub> , mg L <sup>-1</sup>	N-NO <sub>3</sub> , mg L <sup>-1</sup>	N-NH <sub>4</sub> , mg L <sup>-1</sup>	P-PO <sub>4</sub> , mg L <sup>-1</sup>	Chl-a, µg L <sup>-1</sup>
2013	min	17.2	8.36	7.5	89.6	45.9	30.1	0.11	<0.2	0.13	0.60	8.7
	max	25.1	8.7	15.4	158.9	78.3	54.3	0.21		>1.5	4.5	26.7
	mean	<b>21.1</b>	<b>8.6</b>	<b>11.1</b>	<b>124.8</b>	<b>65.3</b>	<b>43.6</b>	<b>0.15</b>		<b>n.a.</b>	<b>1.97</b>	<b>17.7</b>
2014	min	7.8	8.4	10.0	116.1	60.9	39.9	0.11	<0.1	0.14	0.74	9.4
	max	29.3	9.4	14.9	147.2	71.7	49.3	0.61	0.78	>1.5	1.8	37.8
	mean	<b>19.2</b>	<b>8.8</b>	<b>11.9</b>	<b>127.6</b>	<b>66.1</b>	<b>44.5</b>	<b>0.26</b>	<b>n.a.</b>	<b>n.a.</b>	<b>1.3</b>	<b>25.2</b>
2015	min	10.0	8.4	8.1	97.3	11.4	6.3	0.08	<0.1	0.05	0.15	1.5
	max	29.8	8.9	14.8	129.0	60.3	40.2	0.17		0.74	0.85	2.1
	mean	<b>19.6</b>	<b>8.6</b>	<b>10.5</b>	<b>109.8</b>	<b>31.6</b>	<b>19.8</b>	<b>0.12</b>	<b>n.a.</b>	<b>0.33</b>	<b>0.43</b>	<b>1.8</b>
2016	min	18.6	8.6	6.4	79.9	41.3	26.1	0.12	<0.2	0.14	0.27	256.3
	max	27.6	9.5	19.7	>200	83.1	59	0.18	19.3	>1.5	0.69	305.6
	mean	<b>24.1</b>	<b>9.1</b>	<b>12.1</b>	<b>97.9</b>	<b>59</b>	<b>40</b>	<b>0.14</b>	<b>n.a.</b>	<b>n.a.</b>	<b>0.48</b>	<b>280.9</b>
2017	min	17.5	8.7	7.9	72.6	62.8	41.8	0.078	<0.2	0.12	0.08	331.7
	max	29.6	9.1	16.6	172.5	128.6	>72	0.153		>1.5	0.21	400.6
	mean	<b>24.2</b>	<b>8.9</b>	<b>11.3</b>	<b>136.4</b>	<b>97.6</b>	<b>n.a.</b>	<b>0.12</b>	<b>n.a.</b>	<b>n.a.</b>	<b>0.16</b>	<b>366.2</b>

Стойностите на хлорофил-а варират в изключително широк диапазон от 1,8 до 366,2 µg L<sup>-1</sup>, но през по-голяма част от изследвания период индикират хипертрофични условия съгласно фиксираната гранична система OECD (OECD 1982). Солеността се контролира от технологичните изисквания на солодобива и закономерно нараства от пролетта към есента. Поради плиткия характер на лагуната солеността се влияе силно и от метеорологичните условия. Например, през 2015 г. при дълъг дъждовен пролетен период чак през септември солеността достига 40,2%. С изключение на 2015 г., средната соленост на Северен Солник е над 40‰ характерна за

хиперсолени води. Крайните вариации на солеността в Северен Солник за петгодишния период на изследване са в много широк диапазон от 6,3 до > 72‰.

### 5.3.2. Идентификация на прокариотния автотрофен пикопланктон (АПП)

Анализът на 16S ДНК секвенцията на щам РАСС 8945 показва висок процент на идентичност с NCBI 16S rDNA секвенции, принадлежащи към род *Synechococcus*. Тъй като таксономията на разред *Synechococcales* и по-специално на рода *Synechococcus* все още е проблематична, получената в това изследване нуклеотидна последователност (MN061337) е използвана за филогенетични анализи.

За целите на филогенетичните анализи са избрани нуклеотидни последователности на представители на родовете *Synechococcus* (сладководни, морски и видове, обитаващи води с много висока соленост), *Prochlorococcus*, *Cyanobium* и новопредложения род *Parasynechococcus*. Определянето на филогенетичното положение на различните таксони е първият и най-важен критерий в процеса на класификация. Най-често използваният и наложил се молекулярно-генетичен маркер, който осигурява отлична рамка за тестване на филогенетични хипотези, е генът 16S rRNA. Филогенетичното дърво, получено от ML анализа в това проучване, е показано на Фигура 8. Четири отделни клади могат да бъдат разграничени във филогенетичната реконструкция – Клада 1, Клада 2, Клада 3 и Клада 4. Първата клуда (Clade 1) включва морски щамове *Synechococcus* и щамове, предложени като членове на нов род *Parasynechococcus* (Coutinho et al., 2016). Представителите на род *Parasynecococcus* не са монофилетични, а показват полифилетичност, разпръснати във филогенетичното дърво. Тези филогенетични позиции не потвърждават отделянето на *Parasynecococcus* като нов род. Топологията показва необходимостта от нови маркери, които в комбинация с 16S ДНК биха могли да допринесат за решаването на подобни проблеми.

Втората клуда (Clade 2) включва изследвания щам РАСС 8945, който е разположен близо до щам, изолиран от хиперсалинен воден басейн в Румъния и щамове, изолирани от Червено море и Тихия океан, всеки със соленост между 36 и 55 g L<sup>-1</sup> (Keresztes et al., 2012; Coutinho et al., 2016). Клада 3 (Clade 3) съдържа представители на рода *Prochlorococcus* (*Prochlorococcus marinus*). Филогенетичното дърво показва изразена монофилетичност и потенциал за разграничаване на щамове от род *Prochlorococcus* развиващи се при ниска интензивност на светлината (LLI) и висока интензивност на светлината (HLI). Клада 4 (Clade 4) се състои от сладководни цианобактериални щамове от родовете *Synechococcus* и *Cyanobium*. Филогенетичната реконструкция, базирана на NJ алгоритъма показва подобна топология.

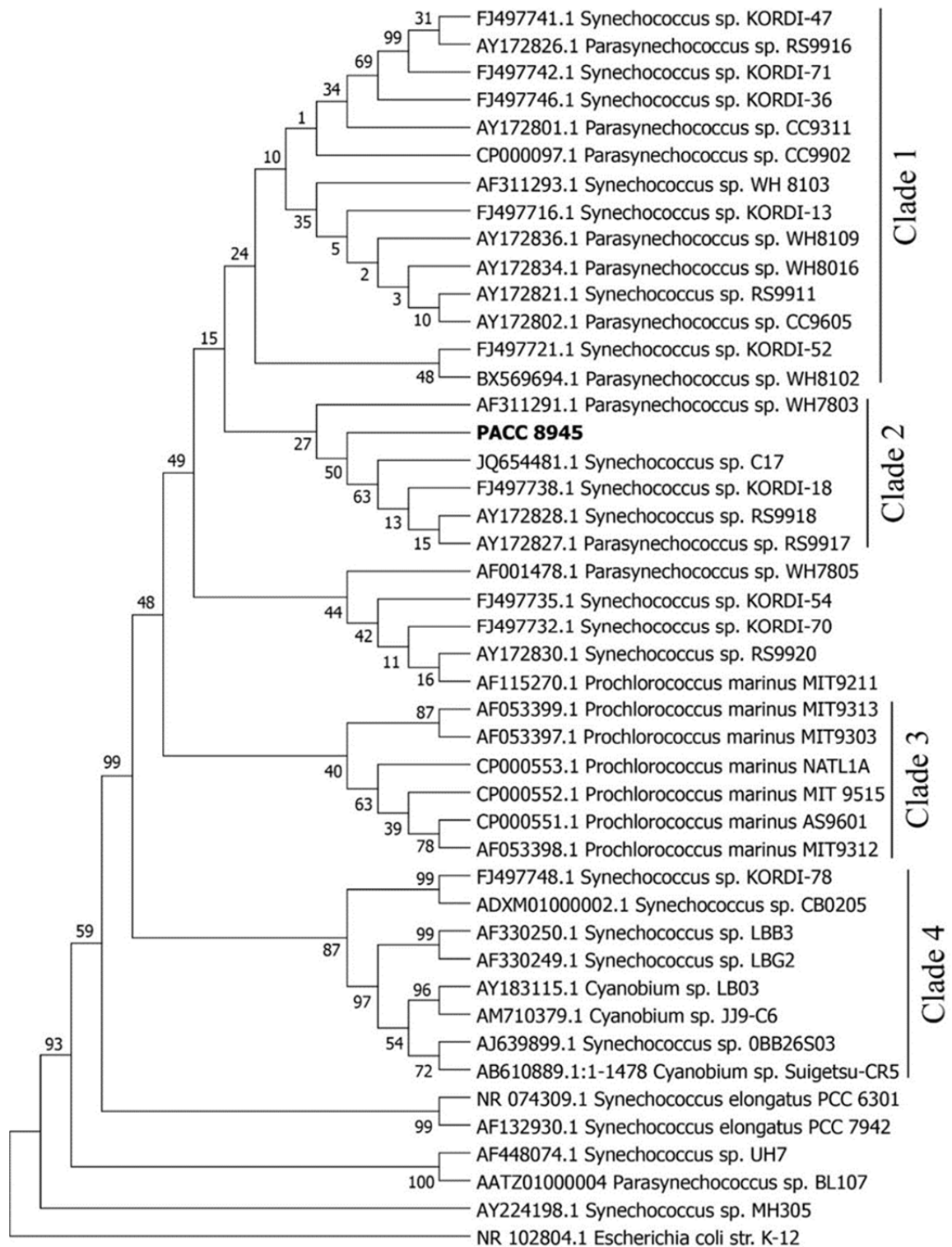
### 5.3.3. Идентификация на еукариотния автотрофен пикопланктон (АПП)

За анализ на филогенетичните взаимоотношения и за изграждане на филогенетичното дърво с цел идентификация на еукариотния автотрофен пикопланктон (АПП) са избрани 18S ДНК секвенции от различни родове, които са показали хомология с целевата нуклеотидна последователност. Приложената селекция включва родовете *Picochlorum*, *Nanochlorum*, *Nannochloris*, *Pseudochloris*, *Marvania*, *Chlorella*, *Auxenochlorella* и *Coccomyxa*. Филогенетичното дърво се състои от 2 кледи (Фиг. 9). Основната клета (Clade 1), включва видове от родовете *Picochlorum*, *Nanochlorum* и *Nannochloris*, а клета 2 (Clade 2) съдържа видове от таксономично отдалечените родове *Pseudochloris*, *Marvania*, *Chlorella* и *Auxenochlorella*.

Изследваният изолат РАСС 8946 показва идентичност на 18S ДНК последователността с холотипа на *Picochlorum oklahomense* (GenBank ацесия AY422073) и *Picochlorum* sp. SENEW3 (GenBank KF591594), изолирани от пойкилохалинно езеро на лагуната Сан Елио, САЩ (Henley et al., 2004; Wang et al., 2014).

Цитоморфологичните особености на еукариотните видове (щам РАСС 8946) също разкриват сходство с *Picochlorum oklahomense*.

Следвайки полифазния подход на настоящата класификация и отчитайки генетичното сходство на щама РАСС 8946 с *Picochlorum oklahomense* и сходството в цитоморфологичните и екологичните маркери, ние идентифицирахме еукариотния вид, част от автотрофен пикопланктон от Северен Солник на Атанасовско езеро, като *Picochlorum oklahomense* Hironaka.



**Фигура 8.** Филогенетично дърво с максимална вероятност (ML) въз основа на 16S ДНК последователности. Анализът включва 16S ДНК последователности на цианобактериални щамове от родовете *Synechococcus*, *Prochlorococcus*, *Cyanobium*, *Parasynechococcus*. Цифрите показват поддръжката на bootstrap. Последователността на 16S ДНК на *E coli* str. K-12 е използван като външна група. Номерата за достъп в GenBank са посочени преди името на вида



#### 5.3.4. Таксономичен състав, изобилие и биообем на фитопланктонната общност

При изследването се установиха малък брой видове (от 10 до 19), които принадлежат към седем таксономични групи: Cyanobacteria, Prasiophyceae, Trebouxiophyceae, Chlorophyceae, Bacillariophyceae, Dinophyceae и Cryptophyceae. Често срещани видове, придружаващи АПП през целия период на изследване, са диатомеите (*Cocconeis placentula*, *Cylindrotheca closterium*, *Triblionella punctata* и *Planorhynchium delicatulum*), зелените водорасли (*Oocystis* sp.) и динофлагелата *Katodinium fungiforme*.

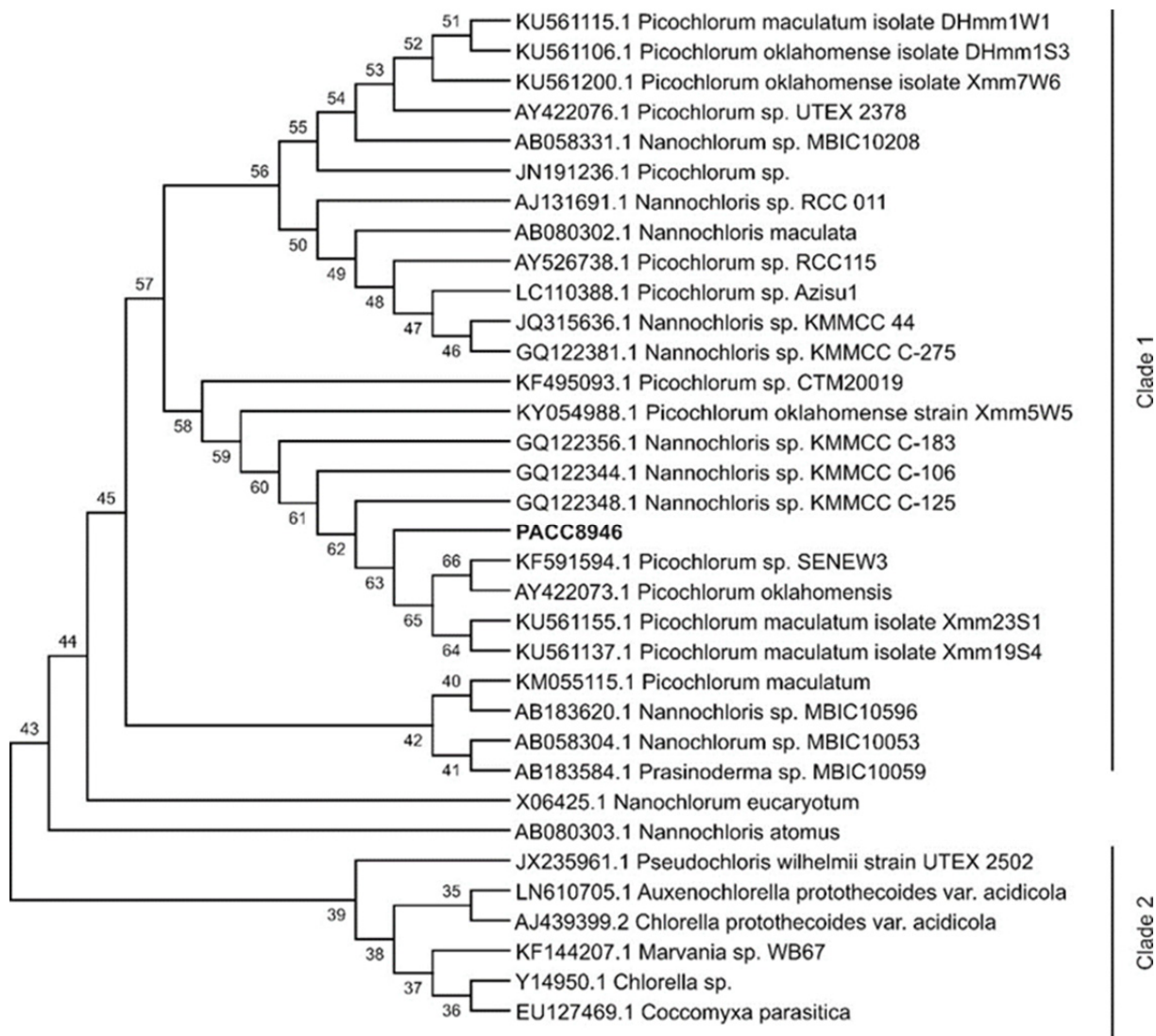
Общият биообем на фитопланктона варира в много широки граници – от 0,6 до 121,7 mm<sup>3</sup> L<sup>-1</sup> (съответно 2015 и 2016 г.). С изключение на 2015 г., съвкупността от АРР видове е доминираща, формираща над 50% от общия биообем. Най-високите средно-сезонни нива на общия биообем (65,4 mm<sup>3</sup> L<sup>-1</sup>) са регистрирани през 2016 г., когато АРР формира над 93% от биообема.

Приносът на АПП към общия обем на фитопланктона достига максимална стойност от 99,3% през юли 2016 г. (T = 27,6°C; S = 59‰). През същия месец автотрофния пикопланктон (АПП) е в състояние на интензивен цъфтеж, с изключително голямо изобилие от 240,1 × 10<sup>6</sup> клетки mL<sup>-1</sup>.

Установено е, че ключов фактор за интензивния цъфтеж на АПП през 2016 г. е диапазонът на соленост 30-59‰, съчетан с по-високата средна годишна температура от 24,1°C.

#### 5.3.5. Статистически анализ

Маркираните с удебелен шрифт корелации (Таблица 4) са значими при р-стойност <0,05. Съществува силна линейна връзка между отговора на променливи С (проводимост) и S (соленост), общия фитопланктонен биообем (ТВ) и изобилието от АПП (AbАРР). Корелациите между експланаторните променливи (ковариати) T (температура), C, S, N-NO<sub>2</sub>, N-NO<sub>3</sub>, N-NH<sub>4</sub>, P-PO<sub>4</sub> и променливите на отговора ТВ, AbАРР, CAPРТВ (Принос на АПП към общия фитопланктон биообем) не са статистически значими. Това означава, че връзката между отговора и ковариатите не е линейна.



**Фигура 9.** Молекулярен филогенетичен анализ, базиран на 18S ДНК последователности на видове от родовете *Picochlorum*, *Nanochlorum*, *Nannochloris*, *Prasinoderma*, *Pseudochloris*, *Auxenochlorella*, *Chlorella*, *Marvania* и *Coccomyxa*

**Таблица 4.** Корелационна матрица на Пиърсън. Съкращения: Т (температура); С (проводимост); S (соленост), AbAPP (изобилие от APP), ТВ (общ биообем); CAPPTВ (Принос на APP към общия биообем на фитопланктона)

	T	C	S	N-NO <sub>2</sub>	N-NO <sub>3</sub>	N-NH <sub>4</sub>	P-PO <sub>4</sub>	AbAPP	ТВ	CAPPTВ
<b>T</b>	1.00	0.18	0.13	-0.03	-0.25	0.18	<b>-0.61</b>	0.18	0.09	-0.36
<b>C</b>	0.18	1.00	<b>0.96</b>	0.12	-0.01	0.48	-0.15	0.13	0.33	-0.04
<b>S</b>	0.13	<b>0.96</b>	1.00	0.06	0.02	0.50	-0.13	0.22	0.34	0.03
<b>N-NO<sub>2</sub></b>	-0.03	0.12	0.06	1.00	0.38	0.22	0.13	0.34	0.36	-0.03
<b>N-NO<sub>3</sub></b>	-0.25	-0.01	0.02	0.38	1.00	0.22	-0.07	-0.09	-0.11	-0.08
<b>N-NH<sub>4</sub></b>	0.18	0.48	0.50	0.22	0.22	1.00	0.26	0.17	0.06	-0.13
<b>P-PO<sub>4</sub></b>	<b>-0.61</b>	-0.15	-0.13	0.13	-0.07	0.26	1.00	-0.10	-0.11	0.18
<b>AbAPP</b>	0.18	0.13	0.22	0.34	-0.09	0.17	-0.10	1.00	<b>0.87</b>	0.40
<b>ТВ</b>	0.09	0.33	0.34	0.36	-0.11	0.06	-0.11	<b>0.87</b>	1.00	<b>0.54</b>
<b>CAPPTВ</b>	-0.36	-0.04	0.03	0.03	-0.08	-0.13	0.18	0.40	<b>0.54</b>	1.00

## 6. Дискусия

Цианобактериалните таксони, установени на базата на полифазния подход, могат и трябва да бъдат таксономично определени не само ако разликите помежду им са ясно дефинирани, но и в случай на крипто-, морфо- или ековидове. Това е важно с оглед познаване на цианобактериалното развитие, биоразнообразие и екология. За постигане на тази цел от изключително значение е допълването и развиването на познанието за различните таксономични критерии (молекулярно-генетичен, морфологичен, ултраструктурен, биохимичен и екологичен). Те биха ни дали възможност за детайлизиране и прецизиране на информацията – основа за таксономията и систематиката на цианобактериите.

В търсене на нови маркери в настоящата дисертация е проверена приложимостта на два клетъчни протеина (OMEP и Psb27) като молекулярни маркери за анализиране на еволюционните връзки и таксономична класификация на цианобактериите. Сравнявайки филогенетичните дървета, базирани на OMEP и Psb27 аминокиселинни секвенции, и 16S рДНК нуклеотидни секвенции чрез четири филогенетични метода (ME, MP, ML и NJ) за различни цианобактериални вида/щама, доказахме, че OMEP и Psb27 могат да бъдат полезни молекулярни маркери за изясняване на цианобактериалната филогения и за таксономична идентификация на цианобактериални родове и видове. Позиционирането на цианобактериите във филогенетичните реконструкции на база OMEP и Psb27 е подобно на това, наблюдавано във филогенетичните дървета на базата на 16S рРНК генни последователности, но те не са еквивалентни. Чрез сравняване на филогенетичните дървета на базата на аминокиселинни последователности за Psb27 например и 16S рДНК нуклеотидни последователности за изследваните 163 цианобактериални вида/щамове, се демонстрира, че Psb27 може да бъде полезен молекулярен маркер за филогенията на цианобактериите.

Анализите показват, че Psb27 последователностите решават филогенетичните позиции на тясно свързани щамове (близкородствени таксони) много по-добре от 16S rDNA последователностите; кладите *Planktothrix*, *Fischerella*, *Microcystis aeruginosa* и *Crocospaera watsonii* получили висока статистическа подкрепа в рамките на дървото Psb27 не могат да бъдат наблюдавани в 16S дървото. Топологията на родовете *Synechococcus* и *Thermosynechococcus* в генерираното филогенетично дърво (Фиг. 4) потвърждава резултатите, получени от Komárek (Komárek, 2018), който обсъжда полифилетичното положение на видовете *Synechococcus* и отделянето на някои специални родове (*Thermosynechococcus* и *Parasynechococcus*).

Като представители на разред *Chroococcales*, родовете *Cyanothece* и *Microcystis* се позиционират заедно (Фиг. 4). Това се наблюдава и във филогенетичното дърво генерирано въз основа на 31 консервирани протеинови последователности и представено и коментирано в Komárek et al., 2014. Такава топология на тези два рода не се наблюдава при филогене-

тичната реконструкция, базирана на 16S рДНК (Фиг. 5). Представителите на двата тясно свързани таксони се разполагат на различни места в 16S рДНК дървото.

Това ни дава основание да твърдим, че филогенетичното дърво, базирано на протеиновите последователности Psb27, има по-добра топология за родовете *Cyanothece* и *Microcystis*. Освен това в Psb27 дървото родовете *Phormidium*, *Moorea*, *Planktothrix*, *Calothrix*, *Fischerella* и други могат да бъдат ясно разграничени от останалите групи. Това позициониране е в съответствие с един от основните принципи на полифазната таксономия, че всички членове на един таксон трябва да бъдат включени само в една филогенетична линия.

Въпреки, че понастоящем 16S рДНК е основния ген, който се използва в прокариотната систематика, той представлява само една малка част от цианобактериалната филогения и много често различни организми, имащи много подобни или дори идентични 16S рДНК секвенции, могат да имат много повече разлики в останалата част на генома (Kampfer and Glaeser, 2012; Swingley et al., 2008). С увеличаване на броя на напълно секвенираните цианобактериални геноми, все по-често за филогенетични анализи се използва метода на конкатенация (обединяване на секвенциите за няколко гена/протеина). Наскоро бяха конструирани няколко филогенетични дървета на базата на обединени секвенции за няколко консервативни протеини (Gupta and Mathews, 2010; Howard-Azzeh et al., 2014; Shih et al., 2013). По този начин бяха определени специфични маркерни протеини за повечето големи цианобактериални клади (Gupta and Mathews, 2010). За съжаление, по-голямата част от тези маркерни протеини са с неизвестни функции. Освен това, метода на конкатенация може да доведе до “свръхинтерпретация“ на филогенетичното диференциране на близкородствени видове и следователно до статистическо противоречие (Kampfer and Glaeser, 2012). По този начин, използването на подбраните гени/протеини трябва да бъдат доказвани за всеки нов изследван таксон, тъй като някои от цианобактериалните видове може да не съдържат тези гени/протеини. Ето защо, за определянето на филогенетичните връзки и таксономичната класификация на близкородствени организми на родово и видово ниво за предпочитане е използването на индивидуалния подход, базиран на един специфичен протеин или на няколко протеина, а не метода на конкатенация. В настоящия дисертационен труд, ние доказахме, че ОМЕР и Psb27 са много полезни маркери за такива анализи.

Нашите анализи показват, че ОМЕР и Psb27 са подходящи маркери за новата филогенетично-базирана система за таксономия и класификация на цианобактерии на родово и видово ниво, защото топологията на филогенетичните дървета представя монофилетични таксони с относително малко на брой видове и високи bootstrap стойности. Не е за пренебрегване и факта, че всички цианобактерии притежават тези протеини.

Проблемът с повечето налични цианобактериални геноми е, че много от секвенираните щамове не са идентифицирани до видово ниво и те са подбрани случайно на базата на различни критерии (икономическо значение, достъпни като култура/изолати, роля за околната среда и т.н.). За правилната класификация и систематика на цианобактериите, от съществено значение е да бъдат секвенирани геномите на типовите видове за отделните родове, които могат да бъдат използвани като референтни секвенции при полифазната таксономия. За съжаление, в днешно време малко геномни проекти са базирани и фокусирани върху този подход. С увеличаване броя на напълно секвенираните геноми за типови цианобактериални видове, проблемите с тяхната таксономична позиция и еволюционни връзки ще бъдат решени.

Водещата роля на молекулярно-генетичните данни в полифазната характеристика на цианобактериите е неоспорима, но както реалната ситуация показва от изключителна важност за нея са и подкрепящите я допълнителни критерии в това число биохимичният критерий. За съжаление, проучвайки научната литература оставаме с впечатлението, че застъпеността на този критерий е по-малка, и съдържанието му като цяло не е особено добре дефинирано. Качественото и количествено съдържание на мастните киселини, количеството каротиноиди, продукцията на цианотоксини и някои други метаболити, наличието на определени гени (например тези определящи наличието на газови вакуоли) – това са като цяло наличните по този критерий данни (Komarek, 2016).

Ясна е необходимостта от изследвания по тази проблематика, както и обогатяване и разширяване на знанията за приложението на този критерий в таксономията на цианобактериите. В отговор на това предвикателство в дисертацията е проучено съдържанието на четирите основни групи фотосинтетични пигмента в цианобактериите: фикоцианини, фикоеретрини, алофикоцианини и фикоеритробилини). В опит да преценим дали тези пигменти могат потенциално да се използват в таксономията на групата и какво практическо приложение биха имали те сме използвали 18 цианобактериални щамове съхранявани в PACC и CCALA. В проучването са използвани различни варианти на методите за култивиране (екстензивно / интензивно), както и различна хранителна среда (Z, BG11 и BBM). Получените данни показват, че течната Z-средата (pH = 8,5) е най-подходяща за култивиране на всички работни щамове, последвани от BBM средата и BG-11. В сравнение с BBM и BG-11, Z-средата има по-ниско съдържание на азот. По-високата продукция на фикобилипротеини в тази хранителна среда корелира със съобщените по-рано данни, че среди с ниско съдържание на азот са по-подходящи за отглеждане на цианобактерии за производство на фикобилипротеини (Simeunovic et al., 2012; 2013). Количеството пигменти, произведени от нашите щамове, надвишава съобщаваното до момента. В подобни изследвания със *Synechocystis sp.* и *Geitlerinema*

*sulphureum*, при оптимални за развитието на тези щамове условия, отчетените концентрации на фикоцианин са съответно 0,023 и 0,071 mg / ml. (Deshmukh&Puranik, 2012; Kenekar&Deodhar, 2013). Представителите на родовете *Anabaena* и *Calothrix* се характеризират с по-голямо производство на фикобилипротеини в сравнение с щамовете от род *Nostoc*, които като цяло произвеждат ниски концентрации и от четирите групи пигменти. Подобни количества от РС и АРС са съобщавани по-рано за щамовете *Anabaena* и *Nostoc* (Simeunovic et al., 2012)

Това проучване показва за първи път потенциала на изследваните 18 цианобактериални щама за производство на фикобилипротеини. След качествено и количествено характеризиране на съдържанието на фикоцианин, алофикоцианин, фикоеритрин и фикоеритробелин е установено, че четири от изследваните щама произвеждат голямо количество фикобилипротеини и биха могли да имат биотехнологично приложение. Данните демонстрират, че два щама на *Microcoleus autumnalis* (РАСС 5511 и РАСС 5527) са продуценти на фикоеритрини (съответно 0,106 и 0,136 mg / ml). Един от изследваните щамове – шам *Microcoleus autumnalis* (РАСС 5522) и един шам на *Leptolyngbya boryana* (ССАЛА 084) са подходящи за биотехнологично производство на фикоцианини (съответно 0,051 и 0,264 mg / ml), както и алофикоцианини (съответно 0,102 и 0,171 mg / ml). От тази гледна точка считаме, че по-нататъшни изследвания свързани с оптимизацията на условията за отглеждане и производството на фикобилипротеини от набелязаните щамове са задължителни. Това ще даде възможност за тяхното масово отглеждане и експлоатация. Данните за качествено и количествено съдържание на изследваните пигменти в работните щамове показват корелация с таксономичната им принадлежност на ниво разред, род и вид и могат да се използват като биохимичен маркер за таксономични цели в групата.

От изключителна важност за таксономията на цианобактериите е екологичния критерий. Неговата роля на арбитър в спорни таксономични позиции предвид наличието на крипто- и морфовидове ще придобива все по-голям значение при преосмислянето и ревизирането на таксономията на цианобактериите. Познаването на екологичните фактори, които са определящи за разпространението и масовото развитие на цианобактериите са важни. Настоящата дисертация включва изследване демонстриращо прилагането на принципите на полифазната таксономия при идентификация на автотрофни пикопланктонни видове в състояние на цъфтеж, съчетано с проучване на движещите абиотични фактори, определящи появата и разпространението на тези видове.

Изследван е таксономичния състав, обилието на фитопланктонното съобщество и контролиращите абиотични фактори в Северен Солник част от крайбрежната лагуна Атанасовско езеро (Черноморски бряг, България), за периода 2013 – 2017 г.



Водите в Северния Солник са алкални, богати на амониев азот (често над обхвата на откриване) и фосфат (Таблица 3). Подобни високи нива на хранителни вещества са съобщени от Wang et al. (2014) за лагуната San Elijo, Калифорния. Високото биогенно натоварване на лагуните се дължи на дългия престой на водата и следователно на многократното рециклиране на хранителни вещества (Kennish&Paerl, 2010). Допълнителен източник на натоварване с азот и фосфор могат да бъдат зимуващи и мигриращи водни птици (Bogos et al., 2008), които са в изобилие в Атанасовското езеро като част от миграционния път Via Pontica. Солеността на Северния Солник се увеличава естествено от пролетта до есента всяка година и този цикличен модел е характерен и за други лагуни (Wang et al., 2014). Поради плитката природа на езерото (0,3 м), солеността е силно повлияна от метеорологичните условия. През последните две години средните сезонни стойности на хлорофил-а са в диапазона на хипереуτροφните условия (Таблица 4). Според Kennish и Paerl (2010) много крайбрежни лагуни са еу- и дори хипертрофични. Автотрофният пикопланктон (АПП) в Северен Солник е представен от малки (2-3  $\mu\text{m}$ ) сферични до овални или цилиндрични клетки, които не могат да бъдат идентифицирани чрез класическата оптична микроскопия. Прегледаната литература показва, че таксоните с размер на пико (<3  $\mu\text{m}$ ) се оценяват чрез конвергентна еволюция и се характеризират с изключително високо филогенетично и физиологично разнообразие (Krienitz et al., 2012; Somogyi et al., 2013). Проведените молекулярно-генетични и филогенетични анализи доказаха, че АПП в Атанасовско езеро е съвкупност от два основни генотипа: *Picochlorum oklahomense* Hironaka (Chlorophyta, Trebouxiophyceae) и морски *Synechococcus* sp. (Synechococcales, Cyanobacteria). Тази констатация е потвърдена от цитоморфологичните характеристики на културите и екологичните данни. Понастоящем се съобщава за вида *Picochlorum oklahomense* от много различни и изолирани местообитания. Те са части от лимно- и халосферата, като соления басейн в Националния резерват за диви животни в Оклахома, САЩ (Henley et al., 2004), вътрешни хиперсолени езера в Румъния (Keresztes et al., 2012) и крайбрежната лагуна в южна Калифорния (Wang et al., 2014). Тези изолирани местообитания осигуряват специфични условия за развитие на ансамбли, доминирани от *Picochlorum oklahomense* и морски *Synechococcus* sp. (в Трансилванските езера, Румъния и Атанасовското езеро, България) или *Picocystis salinarum* (лагуна Сан Елио, Калифорния). Потвърдените местообитания имат следните общи характеристики: плитки, с променлива соленост, хипертрофични и с високи летни температури. Три от тях (лагуната Сан Елио, солниците на Оклахома и Атанасовското езеро) поддържат голямо изобилие от водолюбиви птици. Това потвърждава предположението на Keresztes et al. (2012), че разпространението на видовете пикопланктон между изолирани местообитания е чрез трансфер на водолюбиви птици. Малкият брой асоциирани видове фитопланктон

включва представители от 7 таксономични групи. Повечето от тези видове са космополити в морски или солени води, еврихалинни – напр. диатомовите *Cylindrotheca closterium*, *Triblionella punctata* и прازیнофиците *Polyblepharides amyliifera*, *Pyramimonas micron*. Те са съобщавани от крайбрежни, вътрешни халинни езера или сладководни басейни с висока минерализация. През 2015 г., годината с намалена соленост – 19,8‰ (Таблица 4), идентифицирахме видове, които са широко разпространени в сладководни (понякога и в леко солени) местообитания като цианобактериите *Merismopedia punctata*, *Phormidium chlorinum* и зелени водорасли *Monoraphidium griffithii*, *M. arcuatum* и *Closteriopsis*. Според Vadrucchi et al. (2013) големият градиент на соленост и биогенно натоварване са най-важните фактори, които определят таксономичен състав в крайбрежните лагуни. Фитопланктонните съобщества в крайбрежните лагуни проявяват висока между- и вътрешно-екосистемна таксономична хетерогенност поради тяхната пространствена и времева вариабилност в хидрогеоложките и геоморфологичните характеристики. Това затруднява разработването на индекси за оценка на екологичното състояние на крайбрежните лагуни. По време на 5-годишния период, фитопланктонната общност в Северен Солник е доминирана от АПП който често е достига изключително високо изобилие – от 106 до 108 клетки mL<sup>-1</sup>, до състояние на видим цъфтеж на вода. Голямото изобилие на АПП в плитки, мътни езера се обяснява с увеличеното съотношение на повърхността към обема на клетките, което осигурява по-добро използване на светлината и по-ефективно усвояване на хранителните вещества (Felföldi et al., 2009). Подобно изобилие на АПП (106 до 108 клетки mL<sup>-1</sup>) и дял в общата биомаса 90-100% е съобщено от Felföldi et al. (2009) за евтрофични плитки езера, подобни на Атанасовското езеро. Резултатите показват, че приносът на АПП към общия биообем е силно променлив (от 36 до 99%). Що се отнася до екологичния фактор изобилие на АПП, се предлага непараметричен модел на регресия между него и солеността и температурата като основни абиотични фактори. В изследване на динамиката на пикопланктона в австралийска лагуна, Scharif et al. (2010) също определят солеността като ключов фактор за изобилието на АПП. Регистрирахме най-голямо количество АПП през 2016 г. при соленост 30-59‰ и средни летни температури над 24°C (Таблицы 3). Тези условия стимулират цъфтежа на пикопланктона с принос на АПП към общия биообем на фитопланктона > 93%. Като екологичен оптимум за преобладаване на АПП (над 99% от общия биообем) дефинирахме соленост 59‰ и температура 27,6°C, при които изобилието на АПП достигна стойности, подобни на отчетения максимум (1,08 × 108 клетки mL<sup>-1</sup>) в изключително плитки мътни алкални езера (Somogyi et al., 2009). Температурните стойности в езерото през 2016 г. са близки до оптималната температура на растеж от 30°C в култури от *Picochlorum* sp., щам SENEW3 (Wang et al., 2014). По отношение на солеността широкообхватната хало-

толерантност на *Picochlorum oklahomense* е добре известна и приета като важна, специфична за вида екологична характеристика (Henley et al., 2004; Wang et al., 2014). Въпреки, че в експерименти с култура Wang et al. (2014) установява, че скоростта на растеж на *Picochlorum* sp. (SENEW3) намалява при стойности на соленост над 50‰, в нашите проби от Атанасовското езеро оптималната соленост изглежда е по-висока (59‰). В природни проби от езерото Кабдик (Румъния) едновременно съвместно съществуване на *Picochlorum oklahomense* / *Synechococcus* sp. е открит при физико-химични условия, подобни на Атанасовско езеро: температура = 28,2°C и концентрация на сол 55 g L<sup>-1</sup> (Keresztes et al., 2012).

Поради изключително малкия размер (2-3 µm) и липсата на достатъчни морфологични характеристики за таксономична идентификация, видовете АПП в Северен Солник на Атанасовското езеро са идентифицирани чрез молекулярни и филогенетични анализи на 16S/18S ДНК. Видовете АПП показват генотипна идентичност с морски *Synechococcus* sp. (Synechococcales, Cyanobacteria) и *Picochlorum oklahomense* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). Анализът демонстрира възможността за прилагане на тези молекулярни методи за идентификация на видовете пикопланктон от изолати на природни проби. Използвайки полифазен подход, основан на молекулярни, морфологични и екологични характеристики на природните проби и изолати, се събраха данни за съобществото *Picochlorum oklahomense* / *Synechococcus* sp. Това е първото съобщение за *Picochlorum oklahomense* и морски *Synechococcus* sp. като част от АПП в европейска крайбрежна лагуна. Северен Солник се характеризира с непрекъснат градиент на соленост в границите на зоната на смесване до хиперсалинност (6.3 до 72‰). Водите са алкални, с високи нива на хранителни вещества (амоняк, фосфат) и високи летни температури.

Основните абиотични фактори, които контролират таксономичния състав и изобилието на АПП, са солеността и температурата. Солеността между 30 и 59‰ и средната лятна температура над 24°C осигуряват екологичен оптимум за растеж на АПП при относителен биообем > 93%.

Смятаме, че АПП, в който *Picochlorum oklahomense* е свързан със *Synechococcus* sp. или *Picocystis salinarum* е разпространен в повече крайбрежни лагуни или вътрешни хиперсалинни езера със сходни характеристики на Атанасовското езеро. Предполагаме, че разпространението на видовете пикопланктон е свързано с водолюбивите птици и тези видове пикопланктон могат да бъдат намерени в повече местообитания с голямо изобилие от водолюбивите птици или по техните миграционни пътища.

За в бъдеще, изследванията на таксономичния състав на автотрофния пикопланктон в крайбрежните лагуни и солници трябва да бъдат разширени, поради ключовата му роля на продуцент.

## 7. Изводи

Въз основа на обобщение на резултатите от проведените изследвания могат да се направят следните по-важни изводи:

1. Външният мембранен ефлукс протеин (ОМЕР) може да се използва като нов молекулярно-генетичен маркер за определяне на таксономичния статус и провеждане на филогенетични анализи при цианобактериите на родово и видово ниво.

2. Липопротеинът Psb27 от фотосистема II също е подходящ молекулярно-генетичен маркер за филогенетични анализи и таксономия при цианобактериите както за родово, така и за подродово ниво.

3. Установената корелация между количеството произведени фикобилипротеини и таксономичните позиции на цианобактериите показва възможността за прилагане на тези пигменти като биохимичен таксономичен критерий при решаване на спорни таксономични казуси.

4. Качествената и количествена характеристика на съдържанието на фикоцианин, фикоеритрин, алофикоцианин и фикоертроцианин демонстрира възможността за използването на някои цианобактериални щамове в биотехнологичната индустрия за производство на фикобилипротеини.

5. Два щама *Microcoleus autumnalis* (PACC 5511 и PACC 5527) са подходящи за биотехнологично производство на фикоеритрин, а един щам *Microcoleus autumnalis* (PACC 5522) и един щам *Leptolyngbya boryana* (CCALA 084) са подходящи за биотехнологично производство на фикоцианин и алофикоцианин.

6. Установеното съобщество *Picochlorum oklahomense* / *Synechococcus* sp. в Северен Солник на Атанасовското езеро демонстрира приложимостта на полифазния подход (основан на молекулярни, морфологични и екологични характеристики) за анализ на природни проби.

7. Солеността и температурата са основните абиотични фактори, които контролират таксономичния състав и изобилието на АРР. Соленост между 30 и 59‰ и средната лятна температура над 24°C осигуряват екологичен оптимум за растеж на АРР при относителен биообем > 93%.

## 8. Литература, цитирана в автореферата

- Boros, E., T. Nagy, C. Pigniczki, L. Kotymán, K. V. Balogh, L. Vörös. 2008. The effect of aquatic birds on the nutrient load and water quality of soda pans in Hungary. – *Acta Zoologica Hungarica* 54(S1): 207-224.
- Deshmukh, D. V., and P.R. Puranik. 2012. Statistical evaluation of nutritional components impacting phycocyanin production in *Synechocystis* sp. *Braz. J. Microbiol*, 43, 348–355.
- Felföldi, T., B. Somogyi, K. L. Márialigeti, L. Vörös. 2009. Characterization of photoautotrophic picoplankton assemblages in turbid, alkaline lakes of the Carpathian Basin (Central Europe). – *Journal of Limnology* 68: 385-395.
- Gupta, R.S., and D.W. Mathews. 2010. Signature proteins for the major clades of Cyanobacteria. *BMC Evol. Biol.* 10:24.
- Hahn, A., M. Stevanovic, O. Mirus, and E. Schleiff. 2012. The TolC-like protein HgdD of the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 is involved in secondary metabolite export and antibiotic resistance. *J. Biol. Chem.* 287:41126-41138.
- Hastie, T. J., and R. J Tibshirani. 1990. *Generalized Additive Models*. 1 st. ed. Boca Raton, Florida: Chapman & Hall/CRC.
- Henley, W. J., J. L. Hironaka, L. Guillou, M. A. Buchhem, I. A. Buchhem, M. W. Fawley, K. P. Fawley. 2004. Phylogenetic analysis of the 'Nannochloris-like' algae and diagnoses of *Picochlorium oklahomensis* gen. et sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). – *Phycologia* 43: 641-652.
- Hillebrand, H., D. Dürseken, D. Kirschtel, U. Pollinger, T. Zohary. 1999. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. – *Journal of Phycology* 35: 403-424.
- Howard-Azzeh, M., L. Shamseer, H.E. Schellhorn, and R.S. Gupta. 2014. Phylogenetic analysis and molecular signatures defining a monophyletic clade of heterocystous cyanobacteria and identifying its closest relatives. *Photosynth. Res.* 122:171-185.
- Kampfer, P., and S.P. Glaeser. 2012. Prokaryotic taxonomy in the sequencing era--the polyphasic approach revisited. *Environ. Microbiol.* 14:291-317.
- Kaplan, D., H. E. Calvert, G. A. Peters. 1986. The *Azolla*-*Anabaena azollae* relationship. *Plant Physiol*, 80, 884–890.
- Kennish, M. J., H. W. Paerl. 2010. Coastal lagoons: critical habitats of environmental change. In: Kennish MJ, Paerl HW (eds) *Coastal Lagoons: Critical Habitats of Environmental Change*, Boca Raton, CRC Press, pp. 1-15.
- Kenekar, A. A., and M. A. Deodha. 2013. Effect of varying physicochemical parameters on the productivity and phycobiliprotein content of indigenous isolate *Geitlerinema sulphureum*. *Biotechnology*, 12, 146–154.

- Keresztes, Z. G., T. Felföldi, T. Somogyi, G. Székely, N. Dragoş, K. Márialigeti, C. Bartha, L. Vörös. 2012. First record of picophytoplankton diversity in Central European hypersaline lakes. – *Extremophiles* 16(5): 759-769.
- Komárek, J., and J. Anagnostidis. 2005. *Cyanoprokaryota -2. Tiel / 2nd Part: Oscillatoriales*. Elsevier/Spektrum, Heidelberg.
- Komárek, J. 2005. The modern classification of cyanoprokaryotes (Cyanobacteria). *Oceanolog. Hydrobiol. Studies* 2005, 34, 5–17.
- Komárek, J., J. Kaštovský, J. Mareš, and J.R. Johansen. 2014. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. *Preslia* 86: 295–335.
- Komárek, J. 2016. A polyphasic approach for the taxonomy of cyanobacteria: principles and applications. *European Journal of Phycology*. 51:346-353.
- Komárek, J. 2018 Several problems of the polyphasic approach in the modern cyanobacterial system, *Hydrobiologia*, vol. 811, pp 7-17.
- Krienitz, L., C. Bock, K. Kotut, and W. Luo. 2012. *Picocystis salinarum* (Chlorophyta) in saline lakes and hot springs of East Africa. – *Phycologia* 51: 22-32.
- Kumar, S., G. Stecher, and K. Tamura. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. – *Molecular Biology and Evolution* 33: 1870-1874.
- Kursar, T. A., and R. S. Alberte. 1983. Photosynthetic unit organization in a red alga: relationships between light-harvesting pigments and reaction centers. *Plant Physiol.* 72, 409–414.
- Lu, L., G. Yang, B. Zhu, and K. Pan. 2017. A comparative study on three quantitating methods of microalgal biomass. *Indian J. Geo Marine Sci.* 46, 2265–2272.
- Mabbitt, P.D., S.M. Wilbanks, and J.J. Eaton-Rye. 2014. Structure and function of the hydrophilic photosystem II assembly proteins: Psb27, Psb28 and Ycf48, *Plant Physiology and Biochemistry*, vol. 81, pp 96–107.
- Moslavac, S., K. Nicolaisen, O. Mirus, F. Al Dehni, R. Pernil, E. Flores, I. Maldener, and E. Schleiff. 2007. A TolC-like protein is required for heterocyst development in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Journal of bacteriology*. 189:7887-7895.
- Shih, P.M., D. Wu, A. Latifi, S.D. Axen, D.P. Fewer, E. Talla, A. Calteau, F. Cai, N. Tandeau de Marsac, R. Rippka, M. Herdman, K. Sivonen, T. Coursin, T. Laurent, L. Goodwin, M. Nolan, K.W. Davenport, C.S. Han, E.M. Rubin, J.A. Eisen, T. Woyke, M. Gugger, and C.A. Kerfeld. 2013. Improving the coverage of the cyanobacterial phylum using diversity-driven genome sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 110:1053-1058.
- Simeunović, J. B., S.B. Marković, D.J. Kovač, D. J., A. Č. Mišan, et al. 2012. Filamentous cyanobacteria from Vojvodina region as source of phyco-



- biliprotein pigments as potential natural colorants. *Food Feed Res.*, 39, 23–31.
- Simeunović, J., K. Bešlin, Z. Svirčev, D. Kovač, D., and O. Babić. 2013. Impact of nitrogen and drought on phycobiliprotein content in terrestrial strains. *J. Appl. Phycol.*, 25, 597– 607.
- Somogyi, B., T. Felföldi, K. Solymosi, K. Flieger, K. Márialigeti, B. Böddi, and L. Vörös. 2013. One step closer to eliminating the nomenclatural problems of minute coccoid green algae: *Pseudochloris wilhelmii*, gen. et sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). – *European Journal of Phycology* 48(4): 427-436.
- Stasinopoulos, M.D., R.A. Rigby, G. Heller, V. Voudouris, and F. Bastiani. 2017. *Flexible Regression and Smoothing Using GAMLSS in R*. 1st ed.: CRC Press.
- Swingley, W. D., R. E. Blankenship, and J. Raymond. 2008. Integrating Markov clustering and molecular phylogenetics to reconstruct the cyanobacterial species tree from conserved protein families. *Mol. Biol. Evol.* 25: 643–54.
- Staub, R., 1961. Ernährungsphysiologisch-autökologische Untersuchungen an der planktonische Blaualga *Oscillatoria rubescens* DC. – *Schweiz. Z. Hydrol.*, 23: 82-198.
- Tillett, D. and B.A. Neilan. 2000. Xantogenate nucleic acid isolation from cultured and environmental Cyanobacteria. *J. Phycol.* 36: 251–8.
- Vadrucci, M.R., E. Stanca, C. Mazziotti, S.F. Umani, A. Georgia, S. Moncheva, A. Romano, R. Bucci, N. Ungaro, and A. Basset. 2013. Ability of phytoplankton trait sensitivity to highlight anthropogenic pressures in Mediterranean lagoons: A size spectra sensitivity index (ISS-phyto). – *Ecological Indicators* 34: 113-125.
- Wang, S., W. Lambert, S. Giang, R. Goericke, B. Palenik. 2014. Microalgal assemblages in a poikilohaline pond. – *Journal of Phycology* 50: 303-309.

## Приноси на дисертационния труд

### Оригинални научни приноси

- **Външният мембранен ефлукс протеин (ОМЕР)** е използван за първи път като маркер за провеждане на филогенетични анализи при цианобактерии и се демонстрира, че този протеин може да се използва като **нов молекулярно-генетичен маркер** за изясняване на филогенетичните връзки при цианобактериите на родово и видово ниво.
- **Psb27** е използван за първи път като маркер за провеждане на филогенетични анализи при цианобактерии и този протеин също се предлага като **нов подходящ молекулярно-генетичен маркер** за полифазна таксономия на цианобактериите на родово и подродово ниво.
- За пръв път се прави оценка на продукцията на фикобилипротеини от цианобактериални щамове на *Microcoleus autumnalis* и *Leptolyngbya boryana* и се съобщава способност за биотехнологично производство на фикобилипротеини от тези щамове (PACC 5505, PACC 5522, PACC 5527 и CCALA 084).
- За пръв път се съобщава съобществото *Picochlorum oklahomense* / *Synechococcus sp.* в състава на автотрофен пикопланктон (APP) на европейска крайбрежна лагуна установен чрез полифазен подход като чрез статистически анализи се определят движещите абиотични фактори, осигуряващи екологичен оптимум за растежа на APP – **соленост** в рамките 30 и 59‰ и **средната лятна температура** над 24°C.

### Научни приноси с потвърдителен характер

- Проведените изследвания потвърждават, значението и прилагането на полифазния подход при разрешаване на таксономични казуси в природни условия като случая с видовия състав на автотрофния пикопланктон в Северен Солник на Атанасовско езеро

### Научно-приложни приноси

- **Оценен е потенциала на 18 цианобактериални щамове за производство на фикобилипротеини.** Анализът показва, че три щамове *Microcoleus autumnalis* (PACC 5505, PACC 5522 и PACC 5527) и един щам *Leptolyngbya boryana* (CCALA 084) произвеждат фикобилипротеини в подходящи концентрации за тяхното биотехнологично производство. Съществува реална възможност за масово култивиране и експлоатация на гореспоменатите цианобактериални щамове, за получаване на тези пигменти.
- Предложено е **използването на съставът и количеството на пиг-**

ментите фикоцианин, фикоеритрин, алофикоцианин и фикоеритробилин като допълнителни **биохимични маркери** за разграничаване на цианобактериални щамове на родово и надродово ниво и за решаване на таксономични казуси при цианобактериите.

- **Приложени са принципите на полифазната таксономия и полифазния подход за идентификация на видове пикопланктон от изолати на природни проби.** Използвайки полифазен подход, основан на молекулярни, морфологични и екологични характеристики на природните проби и изолати е идентифицирано съобществото *Picochlorum oklahomense* / *Synechococcus* sp. (Северен Солник, Атанасовско езеро.

#### СПИСЪК НА НАУЧНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИЯТА

- Moten D, Batsalova T, **Basheva D**, Mladenov R, Dzhambazov B, Teneva I. 2018. Outer Membrane Efflux Protein (OMEP) is a suitable molecular marker for resolving the phylogeny and taxonomic status of closely related Cyanobacteria. *Phycological Research*, 66(1): 31-36. DOI: 10.1111/pre.12203 (**импакт фактор – 1.275, Q2**)
- Basheva, D.**, Moten D., Stoyanov, P., Belkinova, D., Mladenov, R., Teneva, I. 2018. Content of phycoerythrin, phycocyanin, allophycocyanin and phycoerythrocyanin in some cyanobacterial strains: Applications. *Eng. Life Sci.*, 18, pp. 861–866 (**импакт фактор – 2.385, Q2**)
- Teneva I, Belkinova D, Moten D, **Basheva D**, Dzhambazov B. 2019. In search of new molecular markers for taxonomic classification of Cyanobacteria. 19th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2019. *Conference proceedings*, vol. 19, issue 5.2, pp. 461-468. DOI: 10.5593/sgem2019/5.2/S20.057 (**SJR – 0.22**)
- Belkinova D, Teneva I, **Basheva D**, Neykov N, Moten D, Gecheva G, Apostolova E, Naimov S. 2021. Phytoplankton composition and ecological tolerance of the autotrophic picoplankton in Atanasovsko Lake (Black Sea Coastal Lagoon, Bulgaria) *Applied Ecology and Environmental Research*, ALÖKI Kft., Budapest, Hungary, 19(2):849-866. DOI: [http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1902\\_849866](http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1902_849866) (OnlineFirst of AEER) (**импакт фактор за 2019 г. – 0.712, Q3**)

## **Благодарности**

Изказвам своята сърдечна благодарност на моите научни ръководители доц. д-р Иванка Тенева и проф. д-р Румен Младенов за мотивацията за започване и завършването на този дисертационен труд, за професионализма, за ясните и целенасочени напътствия, както и за търпението и неограничената подкрепа през целия период на работа.

Благодаря на доц. д-р Детелина Белкинова за оказаното съдействие при провеждането на част от експерименталната работа, както и към всички членове на катедра „Ботаника и МОБ“ към Биологически факултет на ПУ „Паисий Хилендарски“, които по един или друг начин съдействаха при реализацията на настоящия дисертационен труд.

Искрено благодаря на проф. д-р Балик Джамбазов и гл. ас. д-р Джемал Мотен за съвместната работа по молекулярно-генетичните анализи.

Благодаря на моето семейство за моралната подкрепа и вярата им в мен!



