

## Рецензия

От: **проф. Искра Витанова Иванова, дбн,**

Относно: оценка на дисертационен труд за придобиване на образователна и научна степен “доктор” в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление, 4.3 Биологически науки, научна специалност Ботаника. Със заповед № Р33-2097 от 9.06.2021 г. на Ректора на Пловдивския университет „Паисий Хилендарски“ (ПУ) съм определена за член на научното жури.

Автор на дисертационния труд: Дияна Русева Башева

Заглавие на дисертационния труд: ПОЛИФАЗНА ХАРАКТЕРИСТИКА НА ЦИАНОБАКТЕРИАЛНИ ЩАМОВЕ С НЕИЗЯСНЕН ТАКСОНОМИЧЕН СТАТУС

Научни ръководители: проф. д-р Румен Димитров Младенов

доц. д-р Иванка Иванова Тенева

### **1. АКТУАЛНОСТ И ЗНАЧИМОСТ НА РАЗРАБОТВАННИЯ ПРОБЛЕМ**

Цианобактериите са известни като първите кислородни фотосинтетични микроорганизми на Земята и са допринесли за производство на кислород в земната атмосфера през последните 3 милиарда години. Те също са известни като синьо-зелени водорасли и се считат за първични фотосинтетични микроорганизми, открити в различни среда, включително сладка вода, океани, почва и голи скали. Тези микроорганизми съществуват в под формата на отделни клетки, колонии или нишки. Въпреки че цианобактериите са микроскопични по природа, те могат да бъдат видими, когато съществуват под формата на колонии, като кори или цъфтеж. Цианобактериите са единствените прокариоти, които са развили кислородна фотосинтеза, трансформирайки биологията и химията на нашата планета. Геномните и еволюционните изследвания революционизираха нашето разбиране за ранните кислородни фототрофи.

Биологично разнообразие в наши дни са доказателство за техните необикновени, изключително успешни в биологично и екологично отношение, включващи многократни бързи адаптации към различни условия на околната среда в различни екосистеми. Постоянното увеличаване на човешкото население и нарастващите опасения, свързани с енергийната криза, продоволствената сигурност, огнищата на болести, глобалното затопляне и други екологични проблеми, изискват устойчиво решение от природата. Цианобактериите се нуждаят от прости съставки, за да растат и притежават сравнително прост геном.

Известно е, че цианобактериите произвеждат голямо разнообразие от биоактивни съединения. В допълнение, забележителният темп на растеж на цианобактериите позволява нейното потенциално използване в широк спектър от приложения в областта на биоенергията, биотехнологиите, природните продукти, медицината, селското стопанство и околната среда.

Всичко това ми дава основание да оценя като актуална представената научна разработка, с потенциал за научни постижения, които да имат бърза практическа реализация.

## 2. ОБЕМ И СТРУКТУРА НА ДИСЕРТАЦИЯТА

Дисертацията е изложена на 126 стандартни страници текст. Спазена е общоприетата схема и препоръчителните съотношения между отделните части на труда, както следва: *Въведение* – 4стр., *Литературен обзор* – 32 стр., *Цел и задачи* – 1стр., *Материали и методи* – 12стр., *Резултати и обсъждане* – 42 стр., *Дискусия*- 9стр., *Изводи* 1стр. и *Литература* – 19 стр. Получените резултати са илюстрирани с 23 фигури и 10 таблици и са представени 224 литературни източника.

## 3. ЛИТЕРАТУРНА ОСВЕДОМЕНОСТ И ПОСТАНОВКА НА ЦЕЛТА И ЗАДАЧИТЕ

Настоящата дисертация е комплексна и предполага добро познаване на литературните източници и методите за решаването ѝ. Докторантката е направила обстоен преглед на постиженията на други изследователи, които е успяла да предаде и анализира върху 32 страници в литературния обзор. Обзорът представя детайлно състоянието на проблема и доказва необходимостта от разработването на дисертационната теза. Разгледани са редица въпроси, свързани с биоразнообразието, разпространението, екологията, физиологията и взаимоотношенията на отдела **Cyanobacteria** и не на последно място принципите на идентифициране и класификацията им. Въвеждането на по-сложни, значими методи на изследване (електронно-микроскопски и особено молекулярни анализи) се оказват необходими за таксономичната класификация на цианобактериите. Един от най-големите проблеми в съвременната цианобактериална таксономия и тези проблеми, свързани със съвременната цианобактериална система, могат да бъдат решени само при използване на комбинация от методи и критерии генетични, екологични, биохимични, ултраструктурни и морфологични. На вниманието на читателя се предлагат и някои нерешени проблеми. Литературният обзор е конкретен, структуриран е правилно, следвайки логическата обвързаност на информацията. Данните от справката са послужили за ясното и правилно

определяне не само на целта, но и за формулировката на задачите. Поставени са за решаване добре обосновани 8 експериментални задачи.

Литературата (както в обзора, така и в целия труд) е тясно свързана с темата на дисертационния труд. Литературният списък включва внушителния брой от 224 заглавия на латиница. Те са основно от последните години. Това говори за отлична теоретична осведоменост на докторантката и с цел намиране на ново научно предизвикателство.

#### **4. ОЦЕНКА НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ МЕТОДИ И МАТЕРИАЛИ**

Разделът "Материали и методи" демонстрира внушителен набор от методи, съобразени с конкретните изисквания на експериментите. Те са съвременни и адекватни за реализацията на дисертационния труд. Описани са точно и подробно, като изцяло покриват многостранните области на работата: от класическите до модерните изследвания, включващи охарактеризиране на цианопрокаротни щамове и тяхното култивиране. За провеждане на експерименталната част, свързана с амплифициране на външен мембранен ефлукс протеин (Outer Membrane Efflux Protein, OMEP) и неговото валидиране са използвани осем алгологично чисти култури. Представени са методи свързани с определяне на качествения и количествен състав на фикобилипротеините на избрани цианобактерии като биохимичен маркер в таксономията на отдел *Cyanobacteria* като обработка на проби и извличане на различни пигменти (C-PE, C-PC, APC и PEC). Използвани са методи свързани с прилагане принципите на полифазната таксономия за разрешаване таксономичния статус на спорни видове от природна проба от Северен Солник на Атанасовско езеро. Екстракция на ДНК, PCR амплификация и секвениране на прокаротните видове (16S ДНК) и екстракция на ДНК, PCR амплификация и секвениране на еукаротните видове (18S ДНК). В отделните етапи на работата докторантката съчетава умело основни подходи, със съвременни молекулярно-генетични методи и биохимични методи. Всички това ми позволява да дам висока оценка на научното ниво и на отличната подготовка на докторантката, която успява правилно да съчетае многообразие от класически със съвременни методи за целите на дисертацията, успешно решавайки поставените експериментални задачи.

#### **5. ОЦЕНКА НА ПОЛУЧЕНИТЕ РЕЗУЛТАТИ**

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.

Раздел „*Резултати и обсъждане*“ е добре структуриран, подкрепен с табличен и графичен материал, с подходяща интерпретация на получени резултати от чужди научни

колективи. Авторката последователно представя доказателствен материал по своята научна теза, като по този начин логически финализира експериментална работа. Извършена е голяма по обем и разнообразна експериментална работа в рамките на комплексно микробиологично и молекулярно-генетично изследване. Проучени са съществуващите бази данни за геномни и протеинни секвенции на цианобактерии. Подбрани са подходящи молекулярно-генетични маркери за селектиране на няколко цианобактериални клетъчни протеини. 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. 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, ОМЕР) и Psb27 - липопротеин, част от фотосистемата II (PSII), локализиран в тилакоидната мембрана на цианобактериите. Протеинът Psb27 досега не е използван за филогенетични анализи на цианобактерии. Фотосистема II (PSII) е първият компонент на фотосинтетичната електронно-трансферна верига, разположен в тилакоидните мембрани на цианобактерии, водорасли и растения. 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. 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.

Конструиранияте филогенетични дървета, базирани на различни методи, показват висока степен на сходство с малки топологични разлики. Разглежданите в настоящата дисертация еволюционни връзки между 163 цианобактериални вида / щамове, обхващащат 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. Предлаганият нов молекулярен маркер, който може да се използва в комбинация с други за подобряване на филогенетичните реконструкции в цианобактериите на родово и подродово ниво. 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 щама, принадлежащи към различни родове на отдела. Използваните цианобактериални щамове са от водорасловата колекцията на Пловдивски университет (РАСС).

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. Авторката е проучила качествения и количествения състав на основните антенни пигменти фикоеритрини (РЕ), фикоцианини (РС), алофикоцианини (АРС) и фикоеритроцианини (РЕС) при 18 цианобактериални щама – 14 щама от РАСС и 4 щама от ССАЛА и тяхното приложение като биохимичен таксономичен маркер. Включените в изследването щамове принадлежат към 3 разреда, 6 семейства и 10 рода. 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 РЕ, РС и АРС зависи от таксономично положение и условията на култивиране. Ето защо данните, получени в настоящото изследване, показващи корелация между количеството произведени фикобилипротеини 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. 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. Необходимо е да се отбележи биотехнологичното значение на два щама *Microcoleus autumnalis* (РАСС 5511 и РАСС 5527), които са подходящи за биотехнологично производство на фикоеритрин, а един щам *Microcoleus autumnalis* (РАСС 5522) и един щам *Leptolyngbya boryana* (ССАЛА 084) са подходящи за биотехнологично производство на фикоцианин и алофикоцианин.

В природна проба от Северен Солник на Атанасовското езеро, взета през юни 2017 г. при висока соленост (53‰), е установена смес от пикопланктонни видове в цъфтежни концентрации. Тяхното таксономично разграничаване по класическия морфологичен начин е трудно, поради изключително малките им размери. В тази връзка са приложени допълнителни начини за идентификация на тези видове, прилагайки подхода на полифазната таксономия. Особен интерес е наличието във водната проба на цианотоксини от групата на микроцистините. След натрупване на необходимата биомаса от тях бе изолирана геномна ДНК и проведен молекулярно-генетичен анализ.

Установеното съобщество *Picochlorum oklahomense* / *Synechococcus* sp. в Северен Солник на Атанасовското езеро демонстрира приложимостта на полифазния подход

(основен на молекулярни, морфологични и екологични характеристики) за анализ на природни проби. Това е първото съобщение на съобществото *Picochlorum oklahomense/Synechococcus sp.* в състава на АПП в европейска крайбрежна лагуна. Авторката предполага, че разселването на тези пикопланктонни видове е свързан с водоплаващите птиците. 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%.

Получените резултати представени в „Резултати и обсъждане”, логично следват хода на решаването на поставените задачи. Те са обобщени и дискутирани в светлината на публикуваните данни от последните години, Висока оценка заслужават както идеята, така и обемът от изследвания проведен по изпълнението на тази задача и в целия труд. Направената дискусия по всеки експеримент, съпоставката на резултатите за отделните щамове и експерименти, и съпоставката с литературните данни, още веднъж подчертава качествата на докторантката и владенето на експерименталната теория. С това тя доказва, че е овладяла напълно третата степен на обучението си и е завършен експериментатор.

## **6. ПРИНОСИ И ЗНАЧИМОСТ НА РАЗРАБОТКАТА ЗА НАУКАТА И ПРАКТИКАТА, ЗАБЕЛЕЖКИ И ВЪПРОСИ**

Приемам направените приноси.

Дияна Русева Башева е автор в 4 научни публикации, като в една от тях е водещ изследовател, което показва творческата и изследователската ѝ активност при изработването и оформянето им.

Резултатите от изследванията са публикувани в следните научни списания:

- ✓ *Psychological Research*, 66 (импакт фактор - 1.275, Q3; *Eng. Life Sci.*, 18, pp. 861–866 (импакт фактор - 2.385, Q2);
- ✓ *International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2019. Conference proceedings*, SJR - 0.211; *Applied Ecology and Environmental Research*, (импакт фактор за 2019 г. - 0.712, Q4

Към дисертанката имам няколко въпроса:

1. Какви метаболитни пътища използват цианобактериите за автотрофната асимилация на въглеродния диоксид и възможно ли е те да използват въглеводороди в техния метаболизъм?
2. Какви са перспективите за метаболитно инженерство при цианобактериите и как фототрофния метаболизъм формира тяхното развитие?

### 3. Възможно ли е използването на цианобактериите като хранителни източници?

#### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Темата е актуална, докторантката е усвоила съвременни методи, експериментите са поставени методично правилно, получените резултати са достоверни и са солидна база за следващи научни и приложни разработки. Открояват се изключително оригинални научни и приложни приноси. Въз основа на гореизложеното уверено мога да заявя, че рецензираният дисертационен труд представлява оригинална научна разработка, с теоретично и приложно значение. Предложената дисертация е доказателство, че Дияна Русева Башева е развила компетентности необходими за присъждане на образователната степен доктор включващи теоретична подготовка, методологични познания, самостоятелност и опит за планиране на експерименти и способност за анализ на резултатите.

Дисертационният труд съдържа научни, научно-приложни и приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката и отговарят на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и съответния Правилник на ПУ „Паисий Хилендарски“ и давам своята висока оценка за неговата защита и препоръчвам на членовете на научното жури да присъдят на дисертантката Дияна Русева Башева образователната и научна степен „Доктор“ по професионално направление 4.3. Биологически науки, специалност Ботаника.

22.08.2021 г.

Подпис