

РЕЦЕНЗИЯ

от проф., д-р Снежанка Петрова Мончева, Институт по океанология –БАН, Варна

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „доктор“

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

професионално направление: 4.3. Биологически науки

докторска програма: **Ботаника**

Автор: Дияна Русева Башева

Тема: „Полифазна характеристика на цианобактериални щамове с неизяснен таксономичен статус“

Научни ръководители:

проф., д-р Румен Димитров Младенов, ПУ „Паисий Хилендарски“ гр. Пловдив

доц., д-р Иванка Иванова Тенева-Джамбазова, ПУ „Паисий Хилендарски“ гр. Пловдив

1. Общо описание на представените материали

Със заповед № Р33-2097 от 09.06.2021г. на Ректора на Пловдивския университет „Паисий Хилендарски“ (ПУ) съм определена за член на научното жури за осигуряване на процедура за защита на дисертационен труд на тема „Полифазна характеристика на цианобактериални щамове с неизяснен таксономичен статус“ за придобиване на образователната и научна степен ‘доктор’ в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3. Биологически наука, докторска програма Ботаника. Автор на дисертационния труд е Дияна Русева Башева – докторантка в редовна форма на обучение към катедра „Ботаника и методика на обучението по биология“ с научни ръководители проф., д-р Румен Димитров Младенов и доц., д-р Иванка Иванова Тенева-Джамбазова, ПУ „Паисий Хилендарски“ гр. Пловдив.

Представеният от Дияна Башева комплект материали на хартиен/електронен носител е в съответствие с Чл.36 (1) от Правилника за развитие на академичния състав на ПУ и включва необходимите 10 документа надлежно оформени и коректно описани в молбата на докторанта до Ректора на ПУ.

Докторантът е приложил 4 публикации в пълен текст по темата на дисертацията.

Кратки биографични данни за докторанта

Дияна Русева Башева е родена на 21.01.1988г. Като възпитаник на ПУ „Паисий Хилендарски“ Биологически ф-т, през 2011 придобива образователна степен бакалавър – квалификация „еколог“, а през 2013- образователна степен магистър с квалификация „еколог по управление и контрол на околната среда“. В периода на подготовката на магистратурата (2011-2013) заема длъжността хоноруван асистент към катедра „Биология на развитието“ и катедра „Ботаника и МОБ“ и участва в извеждане на упражнения по цитология, клетъчна биология и фикология на студенти от няколко специалности. През периода 2016-2017 преминава допълнително практическо обучение като учител в СУ “ Св. Патриарх Евтимий“ гр. Пловдив по проект BG05M20P001-2.002-0001 “Студентски практики“- Фаза I, а през 2020 специализирано обучение за работа с Централизираната автоматизирана информационна система „Електронни обществени поръчки“. През 2015 е зачислена като докторант в редовна форма на обучение към катедра „Ботаника и методика на обучението по биология“ към ПУ, с тема „Полифазна характеристика на цианобактериални щамове с неизяснен таксономичен статус“. Наред с активната образователна дейност и повишаване на квалификацията си, докторантката участва в научните екипи на два изследователски проекта - един финансиран от ФНИ по конкурс „Финансиране на фундаментални научни изследвания“ (2016-2019) и един финансиран от ФНИ на ПУ (2017-2019), по тематика тясно свързана с темата на докторантурата, което и дава възможност ефективно да бъде включена в изследователския процес и екипна ра-

бота, безспорно заслуга на научните и ръководители. Индикация за изявения интерес към екологичните проблеми и пиетет към научно-изследователската дейност е и активното участие на докторантката в научни форуми, което започва още като студентка (2 студентски научни конференции през 2010 и 2013) и продължава в творческия си процес до сега, включително и с участие в международни форуми, организирани в България. Заслужава внимание и фактът, че от посочените 8 презентации, на 5 докторантката е първи автор, на един втори, както и това, че 5 от докладите са на английски език, свидетелство за личния принос на докторантката в докладваните резултати от проучванията.

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

Големият интерес към цианобактериите (отдел *Cyanobacteria*) е провокиран от тяхната поливалентна функция и значимост, както във фундаментално-научен така и в практически аспект, обусловен от древния им еволюционен произход, висока адаптивност и космополитно разпространение, противоречива екологична роля, от една страна като продуценти на кислород и фиксатори на атмосферен азот и въглерод и от друга, поради екологичния риск за екосистемите и здравето на човека (в резултат на иницираните цъфтежни явления, включително токсични, респективно социално-икономическо значение за различни индустрии като туризъм, аквакултури, хранителна и др.), предопределящи и значението им за мониторинг и оценка на екологичното състояние на екосистемите. Не на последно място, цианобактериите, като продуценти на различни вторични метаболити и биохимични свойства, фокусират вниманието и като източник на биогорива, фармацевтични продукти и потенциал за развитието на съвременните биотехнологии.

Дешифрирането на всички тези специфични особености и възможни приложения са свързани в значителна степен с адекватно познание и надеждна таксономична класификация, докато прокариотната им природа ги прави трудна за класифициране група, поради което принципите за тяхната класификация в контекста на непрекъснато развиващите се познания за еволюционните, генетичните и екологични взаимовръзки са предмет на дългогодишен дебат, независимо от прогреса на науката, включително и молекулярните изследвания.

Съвременната таксономия на отдел *Cyanobacteria* е основана на полифазния подход, считан понастоящем консенсусно за най-адекватен, тъй като интегрира водещата роля на молекулярно-генетичните маркери (rРНК гени, протеин-кодиращи консервативни гени, филогенетични критерии) с подходящи цитоморфологични, ултраструктурни, биохимични и екофизиологични характеристики.

Въвеждането на молекулярно-генетичните маркери е в основата на съвременната пълна реорганизация на съществуващата класификация и прогреса в систематиката и таксономията на цианопрокариотите. Независимо от множеството изследвания, особено в последните години в световен мащаб, и многообразието от тестваните молекулярно-генетични маркери, все още липсват достатъчно на брой сигурни и ефективни, особено за филогенетично базирана таксономична класификация на родово и подродово ниво. В този процес особено осезателна е необходимостта от експериментиране с нови, стабилни молекулярно-генетични маркери, което е един от особено значимите и актуални аспекти на дисертацията.

От друга страна, все още нерешените проблеми със съществуващите криптотаксони, морфотаксони и екотаксони подчертават недвусмислено необходимостта от използването на допълнителни диагностични маркери. В този смисъл особено актуален и значим аспект на дисертацията е анализът на качествено и количествено съдържание на фикобилипротеини и възможността за тяхното приложение от една страна като биохимични таксономични маркери за решаване на спорни таксономични казуси и от друга, като потенциален биотехнологичен ресурс с практическо приложение в медицината, фармацията и хранителната промишленост.

Поради изключително широкото разпространение на пикоцианобактериите в разнообразни биотопи, и особено в екстремални за много организми условия, те имат важно значение за състоянието на природните екосистеми, респективно хидробиологичната и екологична практика и мониторингови изследвания. Изключително дребните им размери обаче, не позволяват идентификацията им и количествено определяне с конвенционални методи и техники. Проведеното теренно изследване в Северен Солник на Атанасовското езеро, недвусмислено демонстрира значимостта на полифазния подход (интегриране на молекулярни, морфологични и екологични характеристики) при изследването на цианопрокаримите и в природни условия и разкрива перспективата за ефективна оценка на таксономичния състав на автотрофния пикопланктон в крайбрежните лагуни и солници и ключовата му роля в мониторинговите изследвания на тези специфични хабитати.

Всичко това ми дава основание да определя настоящото изследване като актуално, значимо и с научно - приложен характер. Формулираните задачи са конкретни и задават алгоритъма за успешното практическото реализиране на целта в пълно съответствие на съвременните тенденции в научните проучвания.

4. Познаване на проблема

Литературният обзор е логично структуриран, целенасочен, изчерпателен, базиран на значителен брой литературни източници, които докторантката използва много умело и творчески. Той предоставя специализирана информация по дадената тема като отразява коректно и цялостно състоянието на проблема за таксономичната класификация на цианопрокаримите в исторически план и понастоящем. Обзорът разкрива широката теоретична подготовка на докторантката, и задълбочено познаване на проблема, както и умение за обобщаване и анализиране на литературните данни с критичен анализ на предимствата, недостига на познание и предизвикателствата по прилагане на полифазния подход и по отделните задачи на проучването. По този начин докторантката убедително обосновава значимостта и иновативните аспекти на поставените в проучването цели и задачи. Списъкът на използваната литература съдържа 224 заглавия, които с изключение на 1 са на латиница и повече от 1/3 са съвременни публикации, излезли от печат през последните 10 години.

Докторантката показва умение да анализира и синтезира наличната информация в контекста на съществуващите дискуссионни аспекти и умело и творчески да я използва при интерпретация на получените собствени резултати. Заслужава да се подчертае професионалният език на който е написана дисертацията и свободното боравене със специфичната съвременна терминология.

5. Методика на изследването

В методично отношение е впечатляващо многообразието от приложените подходи, умелото съчетаване на класически и съвременни методи, лабораторни експерименти и полеви изследвания, което напълно съответства на интердисциплинарния характер на проучването. Приложени са научно-изследователски методи от няколко научни области - фикология, клетъчна и молекулярна биология, биохимия, биоинформатика и методи адекватни на принципите на аутоекOLOGичните изследвания, подчинени на основната цел и задачи на проучването.

Специално внимание заслужава мащабността и обемът на проведените анализи – респективно 82 и 163 щамове за филогенетична реконструкция при тестването на новите генетични маркери, 18 щамове култивирани в различни хранителни среди и при различни условия, съобразени с конкретните изисквания на експеримента при анализа на качествения и количествения състав на 4 вида билификопротеини, теренни проби от 5 годишен период. Избраната

методика на изследване включва съвременни молекулярни методи, разработени през последните 5 години, приложени са модерни статистически анализи, което гарантира качеството и адекватната интерпретация на получените резултати. Методите са описани прецизно и достатъчно пълно, за да бъдат възпроизведени.

6. Характеристика и оценка на дисертационния труд

Дисертационният труд, представен на 128 стр., следва класическата структура и включва Въведение (4 стр.), Литературен обзор (31 стр.), Цел и задачи (1стр.), Материали и методи (12 стр.), Резултати (40 стр.), Дискусия (9стр.), Изводи (1 стр.), Литература (224 източника), Приноси на дисертационния труд (2 стр.) и Списък на научните публикации, свързани с дисертацията (4 броя). Като обем отделните глави от дисертацията са добре балансирани. Въведението представя в резюмиран вид значението и проблемите свързани с цианобактериите, с фокус върху темата на дисертацията. В Литературния обзор, който представлява задълбочено проучване на съществуващите изследвания по темата, е направена кратка характеристика на отдел *Cyanobacteria*, разгледано е развитието на систематиката на отдела, съвременните аспекти и проблеми, приложението и значението на молекулярните методи в цианопрокарриотната таксономия и филогения, с акцент върху полифазната таксономия, размера, организация и пloidията на цианобактериалните геноми.

Целта на дисертационния труд е конкретна, а формулираните задачи са в логична последователност осигуряваща изпълнението ѝ. Използваните материали, научно-изследователски подходи, методи и техники са описани с необходимата прецизност и детайлност. Представени са описание на използваните в разработката цианопрокарриотни щамове и начина на култивиране, протоколите за изолиране на цианобактериална ДНК, условията на амплификация и секвениране на външен мембранен ефлукс протеин (Outer Membrane Efflux Protein, OMEP), Psb27-липопротеин, част от фотосистемата II и 16S р РНК и използваните биоинформатични софтуерни програми. Описани са алгоритмите за провеждане на филогенетичните анализи и направените на тяхната база филогенетични реконструкции.

За извличане и анализиране на билификопротеините е използвана стандартна методика, описана надлежно. С необходимата точност и детайлност са представени и материалите и методите, свързани с прилагане принципите на полифазната таксономия в природна проба, в цялостния процес –пробоотбор, анализи на биологичните проби и параметрите на околната среда, изолиране и култивиране на видове на автотрофния пикопланктон (АПП), екстракция на ДНК, PCR амплификация и секвениране на прокарриотните (16S ДНК) и еукарриотните видове (18S ДНК). Както вече беше подчертано използвани са съвременни статистически методи в програмната R среда, релевантни за анализ на нелинейни зависимости.

Резултатите представят задълбочен анализ на получените данни от проучването, добре структуриран, с доказателствен материал, подкрепящ научната теза и илюстриран с много добре оформени 10 таблици и 23 фигури. Показано е, че топологията на 82-та щам с напълно секвенирани геноми във филогенетичните дървета генерирани при анализа на аминокиселинни секвенции на външния мембранен ефлукс протеин (ОМЕР) и при 4-те алгоритъма за филогенетичен анализ е много сходна, и че повечето видове/щамове принадлежащи към различни родове са групирани в различни клади, подкрепени с високи bootstrap стойности. Добро впечатление прави фактът, че за случаите, при които видове от различни родове са групирани заедно при висока bootstrap поддръжка, докторантката търси възможно обяснение в контекста на съществуващите изследвания, което подчертава нейната компетентност и умения за интерпретация на получените резултати, всъщност валидно за цялото проучване. „Ефективността“ на ОМЕР убедително е илюстрирана чрез сравнителен анализ на филогенетичната реконструкция на същите 82 щам на база 16S рРНК генни секвенции (считан на този етап за „златен стандарт“ при цианобактериалната таксономия), особено при кладите *Microcystis aeruginosa* и *Crocospaera watsonii*. Резултатите от новопредложения молекуляр-

но-генетичен маркер са и практически валидирани чрез използване на цианобактериални щамове от РАСС.

Аналогичен подход на анализ е приложен и при тестването на Psb27 протеиновия маркер, като са използвани 163 цианобактериални щамове. Демонстрирано е, че повечето от видовете, които са монофилетични и имат висока статистическа подкрепа във филогенетичната реконструкция на база Psb27, не се групират заедно на база 16S рРНК (напр. *Planktothrix*, *Fischerella*, *Microcystis aeruginosa* и *Crocospaera watsonii*) и което е особено ценно, че Psb27 последователностите решават филогенетичните позиции на тясно свързани щамове много по-добре от 16S рРНК последователностите, което обосновава приложимостта на Psb27 за подобряване на филогенетичните реконструкции в цианобактериите на родово и подродово ниво. Счита се, че дисертационният труд демонстрира успешно и възможността да се използва капацитетът на генетичните бази данни при проучването и разработването на нови молекулярно-генетични маркери, което е особено важно като подход при тестването и разрешаването на хипотези, формулирани на базата на морфологични или физиологични данни.

Представени са резултатите от анализа на 4 вида билификопротеини (фикоеритрин, фикоцианин, алофикоцианин и фикоеритроцианин) при 18 щамове цианобактерии, като в резултат на експериментиране с 3 вида хранителни среди при екстензивно и интензивно култивиране са определени оптималните условия за продукцията им. Чрез сравнителния анализ на пигментните профили е демонстрирана специфичността на производството на фикобилипротеини за всеки щам и корелацията между количеството фикобилипротеини и таксономичните позиции на ниво разред и род. Оценен е и реалният потенциал за практическо използване в биотехнологиите на 2 щамове *Microcoleus autumnalis* (РАСС 5511 и РАСС 5527) и *Leptolyngbya boryana* (ССАЛА 084), добре аргументирано в сравнителен анализ със съществуващата информация от изследвания на други автори.

Достоинство на разработката е дизайнът, обемът от изследвания и анализът на резултатите от проучване на фитопланктонното съобщество и контролиращите абиотични фактори в част от крайбрежната лагуна Атанасовско езеро (Северен солник), което дава възможност на докторантката да участва и усвои цялата комплексност и мултидисциплинарност на екологичното проучване и да демонстрира ролята на полифазния подход при определяне на таксономичната принадлежност на аеробен пикопланктон (АПП) от природни проби, с което тя се справя отлично. На базата на анализирания данни от 5 годишен период статистически достоверно са определени ключовите фактори на средата и оптималните им значения, при които се развива АПП до цъфтежни концентрации, като доминант във фитопланктонното съобщество (> 93% от общия биообем). Интегрирането на молекулярни, морфологични и екологични характеристики при анализа, позволява за пръв път да се характеризира съобществото *Picochlorum oklahomense* / морски *Synechococcus sp.* като част от АПП в европейска крайбрежна лагуна.

Смятам, че получените резултати са изложени коректно и тяхната достоверност не подлежи на съмнение.

Задълбочената дискусия по всеки експеримент от проучването в контекста на съществуващите литературните данни от други автори, безспорно подчертава уменията на докторантката за творчески интерпретация на получените резултати в перспективата на необходимите допълнителни изследвания и синтез в адекватни изводи. Формулираните 7 основни извода са ясни и конкретни.

7. Приноси и значимост на разработката за науката и практиката

Приемам справката за постигнатите от изследването резултати като оригинални научни приноси, научни приноси с потвърдителен характер и научно-приложни приноси.

Като най-важни приемам следните приноси с оригинален научен и научно-приложен характер:

- Външният мембранен ефлукс протеин (OMEP) и Psb27 липопротеин са използвани за първи път като маркер за провеждане на филогенетични анализи при цианобактерии и се демонстрира, тяхната приложимост като нови молекулярно-генетичен маркери за изясняване на филогенетичните връзки при цианобактериите на родово и видово ниво.
- За първ път се прави оценка на продукцията на фикобилипротеини от цианобактериални щамове на *Microcoleus autumnalis* и *Leptolyngbya boryana* (РАСС 5505, РАСС 5522, РАСС 5527 и ССАЛА 084) и се обосновава потенциалът им за биотехнологично производство на фикобилипротеини.
- Предложено аргументирано е използването на състава и количеството на пигментите 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
- За първ 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 абиотичните фактори, като екологичен оптимум за развитието на APP – соленост в рамките 30 и 59 ‰ и средната лятна температура над 24 ° С.

Считам, че настоящият дисертационен труд има значим принос за развитието на полифазния подход в таксономията на цианобактериите, чрез генериране на ново знание за различните таксономични критерии - молекулярно генетичен, биохимичен и екологичен, разкрива перспективата за ефективна оценка на таксономичния състав на автотрофния пикопланктон в природни условия, със сериозен потенциал за приложение във фундаментална научна област каквато е цианобактериалната таксономия и практиката (хидробиологичен мониторинг и биотехнологии).

8. Преценка на публикациите по дисертационния труд

Докторантът е приложил 4 броя публикации, свързани с дисертацията, три от които са публикувани в специализирани реномирани списания с импакт фактор, и една в сборник от международен форум с SJR. И 4-те публикации са с висока научна стойност изследвания, отразени в международната база данни SCOPUS. По публикационна активност докторантката надхвърля (респективно 2-3 пъти) минималните национални изисквания и критериите на Биологически ф-т за придобиване на ОНС „доктор“.

9. Лично участие на докторанта(ката)

Очевидно и напълно обяснимо е, че тематиката и обемът на разработката предполагат работа в екип, и тук ролята на научните ръководители е задължително да бъде отбелязана. Демонстрираните уменията за творчески интерпретация на получените резултати, свободно владеене на научната терминология и участието на докторантката в 4-те публикации, на една от които е първи автор, не оставят никакви съмнения, за личния принос на докторанта за получени резултати и формулираните приноси.

10. Автореферат

Авторефератът напълно съответства на изискванията на съответните правилници, като точно са отразени основните резултати и научни приноси на дисертацията.

11. Критични забележки и препоръки

Критични бележки към дисертационния труд по същество нямам, от техническо естество, ще отбележа използването на редица чужди термини, за които има подходящ български превод, някои стилови неточности и граматични грешки. За препоръчване е да се прилага Списък със съкращения, което би улеснило четенето на дисертацията.

12. Препоръки за бъдещо използване на дисертационните приноси и резултати

Докторантката в дискусиата по отделните експерименти проактивно набелязва необходимостта от бъдещи изследвания в различни аспекти. И тук ще отправя моите адмирации към проф. Младенов за успешните му усилия да създава експертен капацитет за развитие на модерна и перспективна наука.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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“. Представените материали и дисертационни резултати напълно съответстват на специфичните изисквания на Факултета по Биология, приети във връзка с Правилника на ПУ за приложение на ЗРАСРБ.

Дисертационният труд показва, че докторантката Дияна Русева Башева притежава задълбочени теоретични знания и професионални умения по научна специалност Ботаника като демонстрира качества и умения за самостоятелно провеждане на научно изследване.

Поради гореизложеното, убедено давам своята **положителна оценка** за проведеното изследване, представено от рецензираните по-горе дисертационен труд, автореферат, постигнати резултати и приноси, и **предлагам на почитаемото научно жури да присъди образователната и научна степен „доктор“** на Дияна Русева Башева в област на висше образование: **4. Природни науки, математика и информатика**, професионално направление: **4.3. Биологически науки**, докторска програма **Ботаника**.

25.08.2021 г.

Рецензент:

(проф. д-р Снежанка Мончева)