

РЕЦЕНЗИЯ

от дбн Димитър Асенов Иванов, професор
Институт по биоразнообразие и екосистемни изследвания
при Българската академия на науките

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен 'доктор'

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

Професионално направление 4.3. *Биологически науки*

Докторска програма *Хидробиология*.

Научно направление: *Молекулярна таксономия на фитопланктонни видове от Черно море*

Автор: Нина Стойчева Джембекова

от Институт по океанология „Проф. Фритьоф Нансен“ при Българска академия на науките

Тема: Молекулярна таксономия и екология на потенциално токсични фитопланктонни видове в Черно море

Научни ръководители:

Проф. д-р Снежана Петрова Мончева

Доц.д-р Петя Павлова Иванова

Със Заповед № 118/03.07.2018 г. на Директора на *Института по океанология при БАН* съм определен за член на научното жури за осигуряване на процедура за защита на дисертационен труд на тема "Молекулярна таксономия и екология на потенциално токсични фитопланктонни видове в Черно море" за придобиване на образователната и научна степен „доктор“ в област на висше образование 4. *Природни науки, математика, информатика*, професионално направление 4.3. *Биологически науки*, докторска програма *Хидробиология*. Автор на дисертационния труд е **Нина Стойчева Джембекова** – докторант в редовна форма на обучение към *Института по океанология при БАН*, с научни ръководители проф. д-р Снежана Петрова Мончева и доц.д-р Петя Павлова Иванова от Института по океанология при БАН

Представените от Нина Стойчева Джембекова комплект материали на хартиен носител са в съответствие с Правилника на ИО-БАН за развитие на академичния състав на института и включват следните документи:

1. молба до директора за откриване на процедура;
2. доклад от ръководителя на секцията;
3. протокол от заседание на секцията;
4. списък на публикациите;
5. заповед за зачисляване в докторантura;
6. протокол от издържаните изпити;
7. диплома за образователно-квалификационна степен 'магистър';
8. автобиография по европейски формат;
9. автореферат;
10. дисертационен труд.

2. Кратки биографични данни за докторантката

Нина Стойчева Джембекова завърши Техническия университет – Варна, през 2003 г. бакалавърска програма Екология и опазване на околната среда, а през 2004 г. – магистърска програма по същата специалност. Тя е провела няколко специализации – по мониторинг на токсични фитопланктонни видове в Политехническия университет на Марке-Анкона, Италия, по молекулярни методи за идентификация на фитопланктонни видове и по молекулярни методи за мониторинг на токсични фитопланктонни видове в Националния Изследователски център за ихтиологични изследвания, Йокохама, Япония. Представила е списък с общо 11 научни публикации (от тях 4 са свързани с дисертационния труд), участва в три научни проекта, представила е резултати на две научни конференции и има спечелена стипендия на Японската асоциация на жените в университетите.

Докторантката е изпълнила всички дейности по Индивидуалния си план и е отчислена с право на защита. С решение на разширен семинар на секция „Биология и екология на морето“ към Института по океанология, състоял се на 25 юни 2018 г. дисертационният труд е насочен за защита след обстойно обсъждане и детайлен анализ.

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

Проблемите по опазване на околната среда са особено актуални, не само през последните години и десетилетия, но и за нашето непосредствено бъдеще. Предизвикателствата пред опазването на морските екосистеми са още по-наболели. В това отношение биотоксините произвеждани от морски фитопланктонни видове са от съществено значение за промишлените рибни ресурси и морски култури. Те представляват реална заплаха за различни представители на морската фауна и за морските екосистеми и са в състояние да причинят огромни икономически загуби. Всичко това определя засиления интерес към тях не само сред научната общност, но и от страна на отговорните държавни институции. Наблюдаваната в последните години глобална тенденция на увеличаване на случаите на токсични фитопланктонни цъфтещи е повод за сериозна тревога. Подобни цъфтещи не са изключение и за Черно море.

Традиционните микроскопски методи за определяне на водораслите не винаги са достатъчно ефективни – напр. твърде малки размери на индивидите, недостатъчно ясни таксономични белези за разграничаване на видовете, необходимостта от наблюдения над жизнения им цикъл, който обикновено е с продължителен характер. Тези чисто практически ограничения при изследването на фитопланктонното разнообразие и структура на съобществата изискват прилагането на нови методи и подходи, които да подобрят възможностите за оценка на риска от формиране на токсични цъфтещи и за управление на морските ресурси, застрашени от токсични явления.

Бурното развитие на молекуларната биология през последните десетилетия предлага нов набор от методи за изследване на биоразнообразието на морския фитопланктон. Тези иновативни техники са с огромен потенциал при разработване на научно обосновани мониторингови програми от „ново поколение“. Генетичните методи все по-често се използват за изясняване и прецизиране на систематиката, филогенията и еволюцията на растителните видове. В допълнение трябва да се посочи, че Черно море остава все още недостатъчно проучено по отношение на генетичното биоразнообразие на фитопланктона. Това налага разработването на прецизни, усъвършенствани методи за

идентификация на видовете и прилагането им като ефективен инструмент за мониторинг на потенциално токсичните микроводорасли, съгласно изискванията на Рамкова Директива за Морска Стратегия, 2008/56/ЕС за подобряване на морските мониторинговите програми.

Казаното по-горе ясно определя актуалността на представения за защита дисертационен труд. Формулираната основна цел на изследването: „изясняване на таксономичната принадлежност на потенциално токсични фитопланктонни видове, представени в българската акватория на Черно море, чрез прилагане на молекуларни подходи, както и прецизиране на видовия състав на род *Pseudo-nitzschia* и проучване на аутекологичните му характеристики в локален мащаб“ е в съзвучие с актуалността на темата.

4. Познаване на проблема

Литературният преглед е изложен на 21 стр., съдържа значителен обем информация и показва, че докторантката е много добре запозната с наличната литература и с проблематиката, върху която работи. Той е структуриран в 5 части, които представлят: физикохимична характеристика на крайбрежната акватория на Черно море пред българския бряг; проблемите на токсичния фитопланктон - формиране и въздействия върху екосистемите на водорасловите цъфтежи, токсини и видове отравяния причинявани от тях; обзор на потенциално токсичните фитопланктонни видове и установените досега токсини от тях в Черно море; анализ на молекуларни методи за изследване на токсични фитопланктонни видове; изследвания върху род *Pseudo-nitzschia* в Черно море, в различни аспекти – токсичност на видовете, зависимост от факторите на средата, молекуларните маркери и др..

Прегледът на литературата показва, че изследванията проведени до момента в Черно море върху проблема „токсичен фитопланктон“ са недостатъчни. Необходимо е задълбочено изследване на таксономията и екологията на потенциално токсичните микроводорасли и изследване на зависимостта им от факторите на средата. Трябва да се отбележи, че направеният литературен преглед е не просто с констативен характер, а е аналитично проведен и критично обсъден. Също така, информацията от този преглед е ползвана по-нататък в изследванията и анализите направени в дисертацията.

5. Методика на изследването

Избраните методи на изследване са на съвременно научно и приложно ниво, актуални и с доказано качество и прецизност. За инвентаризация на потенциално токсичните фитопланктонни видове в българската акватория на Черно море и проучване на пространствено-времевата им вариабилност и за оценка на зависимостта на качествения и количествен състав на потенциално токсичните видове от някои екологични фактори на средата, са анализирани данни от фитопланктонни пробы от 67 станции, събиранни в един продължителен период от 15 години. Пробонабирането за молекуларните изследвания е извършено в канала свързващ Варненския залив с Варненското езеро – място с високатаeutрофност и съответно по-висока концентрация на фитопланктонни видове. За изолиране на ДНК е приложен основно метода СТАВ при спазване на съответните протоколи. Приложени са съвременни методи за секвениране – полимеразна верижна реакция (PCR амплификация) и пиросеквениране, тристилков PCR подход за конструиране на paired-end библиотеки, а за съпоставяне на получените секвенциите е използван софтуерен пакет MEGA7. По отношение

на генетичните изследвания може да се каже, че са извършени на най-съвременно научно ниво. В допълнение са използвани и традиционни методи – морфологична таксономична обработка на пробите, анализ на зависимостта между някои физико-химични фактори на средата и развитието на потенциално токсични диатомеи и др. Общо методичната част е детайлно разработена и представена на 28 стр. текст, което е напълно правилно с оглед на обяснението на приложения набор от нови методи.

6. Характеристика и оценка на дисертационния труд

Представеният дисертационен труд е в обем от 193 страници текст, съдържа 9 глави, 35 фигури, 17 таблици и 7 приложения. В литературата са цитирани 461 заглавия, от които 51 на кирилица, 407 на латиница и 3 интернет страници. Целта и задачите са ясно поставени и обосновани. Работната хипотеза е правилно формулирана, с оглед на очакваните резултати. Структурата и организацията на дисертацията е в пълно съответствие с поставените цел и задачи. Към представената структура имам само една забележка. Целта и задачите според мен трябва да са преди литературния обзор. Логически те предхождат обзора, който се явява като продукт зависещ от целта на изследването, от хипотезата и задачите и съответно търсенето на литературни източници в зададеното направление.

Основна част от дисертацията е глава **V. Резултати и обсъждане**, която ще се разгледам по-долу.

Флористичният анализ показва, че състава на алгофлората включва 83 таксона, от които 73.5% определени до ниво вид. С най-голямо видово разнообразие е клас *Dinophyceae* (28 вида), следвани от кремъчните водорасли – *Bacillariophyceae* (16), *Cryptophyceae* (8), *Prymnesiophyceae* (7), *Mamiellophyceae* (4), *Dictyochophyceae* (3) и останалите са представени с по 1 или 2 вида. Установени са нови видове за българската акватория и за Черно море.

Установено е, че високото междувидово генетично сходство при някои потенциално токсични фитопланктонни родове (*Prorocentrum*, *Alexandrium*, *Pseudonitzschia*) затруднява интерпретацията на резултатите на ниво вид. В изследваните преби са установени 12 потенциално токсични вида, определени със сигурност до видово ниво, докато при някои таксони видовата идентификация е невъзможна, поради еднакво подобие с два или повече вида.

Молекулярен подход предлага различен поглед върху микробиалното разнообразие на естествените водни екосистеми. Метагенетичният анализ, и по-специално платформата MiSeq, притежава огромен потенциал за анализ на биоразнообразието на планктонни съобщества, и позволява идентифициране на видове, несъществуващи по-рано в Черно море, в това число и потенциално токсични. Дисертационният труд представлява пръв опит за изследване на еукариотното фитопланктонно разнообразие и мониторинг на потенциално токсичните видове в българската акватория на Черно море с прилагане на такова високоефективно секвениране от ново поколение. Този подход е особено важен за видовете с неясни морфологични белези, които много трудно могат да бъдат определени с традиционния светлинен микроскоп. Въпреки някои присъщи на метода ограничения (недостатъчно точни количествени данни, неяснота за жизнения стадий на развитие на клетката, улавянето на извънклетъчна ДНК), той дава възможност за създаване на регионална база данни и допълване на международните генетични бази данни.

По настоящем метагенетичният подход за мониторинг на морски фитопланктон намира своето приложение като ефективно допълнение към класическите морфологични методи.

Прилагането на традиционни морфологични техники за идентификация на род *Pseudo-nitzschia* на видово ниво се оказват неподходящи за програмите за мониторинг на потенциално токсичен фитопланктон. Ето защо молекуларните технологии имат голям потенциал за подпомагане на тези програми и прецизиране на получените данни. С тяхна помощ са установени три вида *Pseudo-nitzschia* – *P. calliantha*, *P. linea* и *P. pungens* var. *aveirensis*. *P. calliantha* е нов за българската акватория, но се среща в други черноморски райони. *P. pungens* var. *aveirensis* е установяван досега само в турски води. *P. linea* не е описан досега за Черно море. Генетичните данни за *Pseudo-nitzschia* от българската акватория са депозирани в международната генетична база данни и съответно са достъпни за други изследователи. Идентифицираните три вида *Pseudo-nitzschia* показват възможностите на молекуларния подход видова идентификация с използване на специфични праймери.

Специфичните условия на средата в Черно море вероятно са фактор, влияещ върху отсъствието (досега) на мащабни токсични явления от местни изолати на *Pseudo-nitzschia*. Но няма основания да се смята, че такива няма да се появят в динамичните промени на околната среда. Възможно е и черноморските видове да имат специфични генетични различия които да влияят върху токсичността им.

7. Приноси и значимост на разработката за науката и практиката

Дисертационният труд притежава реални научни и особено научноприложни приноси. Част от тях описах в предходната точка от рецензията. В дисертацията и в автореферата, докторантката изтъква няколко основни приноса, които аз приемам напълно, тъй като те са в съответствие с поставените цели и постигнатите резултати. Накратко това са:

- проведен е успешен опит за изследване на еукариотното фитопланктонно разнообразие и мониторинг на потенциално токсичните видове в Черно море;
- установени са нови фитопланктонни видове за Черно море;
- за първи път е анализирано генетичното разнообразие на род *Pseudo-nitzschia* в българската акватория на Черно море и са установени нови видове и вариетети;
- за първи път е тестван метагенетичният подход за осъществяване на мониторинг на потенциално токсичните видове фитопланктон в българската акватория;
- получени са нови данни за потенциално токсични видове, което може да се използва за превенция на възможни негативни ефекти върху околната среда и човека;
- потвърдени са възможностите на молекуларната идентификация за определяне на видове от род *Pseudo-nitzschia*.

8. Преценка на публикациите по дисертационния труд

Във връзка с дисертационният труд са представени 4 броя публикации, които са напълно достатъчни и покриват изискванията на Правилника за развитие на академичния състав на ИО-БАН. Публикуваните материали имат качествата на завършени научни трудове и са части от дисертационния труд.

9. Лично участие на докторантката

По начина, по който е представен дисертационния труд, провеждането на изследванията, анализа и интреprетациите мога да стигна до извода, че този труд е дело на докторанта. Личното участие е видимо във всички пунктове по темата. Формулираните

приноси и получени резултати, са лична заслуга на Нина Джембекова. Разбира се, трябва да се отчете и високата квалификация на научните ръководители, под чието ръководство е изработена дисертацията, и което е гаранция за качеството на изследванията.

10. Автореферат

Авторефератът е направен според изискванията и отразява коректно основните резултати постигнати в дисертацията.

11. Критични забележки и препоръки

Дисертационният труд на ас. Нина Джембекова е изработен прецизно, акуратно и коректно, както по отношение на данните, така и по отношение на аналитичната част, на интерпретациите и изводите. Имам някои препоръки, които представям по-долу.

Напълно наясно съм с трудностите при превода на редица специфични темини от английски на български, на поне за част от тях това може да стане. Странно звучат напр. „микроарей формат“, „олигонуклеотидни сонди“ и др.

Според мен не е правилно да се използва термина „протисти“ за едноклетъчни водорасли. Протистите (Protista) са парафилетична група организми, включваща всички еукариоти, които не се причисляват към царствата на гъби, растения или животни. Но според съвременните схващания, някои от проблемните групи отнасяни в миналото към протистите отдавна са възприети като растителни организми. Още по-малко коректно е да се наричат протисти едноклетъчни представители от отделите на зелените, кремъчните и др. водорасли.

Някои термини трябва да се изчистят – напр. „рибозомна“ РНК, което е правилно да се използва, вместо „рибозомална“. Или какво означава „оперативни таксономични единици“? Също така за термина „риботипове“ – напълно ясно е, че те се отделят с помощта на молекуларна техника за идентификация и характеризиране (ribotyping), която използва информация от филогенетични анализи базирани на рРНК. Това е бърз и специфичен метод с широко приложение. Въпросът ми е дали няма по-подходящ термин на български език?

Бих препоръчал таксоните да се подреждат по таксономичен ред, а не по азучен. Напр. табл. 4 където те са подредени по азучен вид на родовете. Логично е да се подредят по класове, което ще илюстрира много по-добре биологичното разнообразие на алгофлората.

Макар и да не е обект на дисертацията, в нея се споменават и синьозелените водорасли. Според съвременните схващания, те са прокариотни организми отделени в Надцарство Procaryota. Съответно за тях вместо *Cyanophyceae* (*Cyanophyta*) трябва да се използва *Cyanoprokaryota* (*Cyanobacteria*), което е в съответствие с кодекса за ботаническа номенклатура (вж. International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Shenzhen Code) (2018) adopted by the Nineteenth International Botanical Congress Shenzhen, China, July 2017).

От чисто таксономична гледна точка за мен е интересно дали сте правили опити да определите видовете от род *Pseudo-nitzschia* с помощта на сканиращ електронен микроскоп? Морфологията на кремъчните водорасли е основа за тяхната класификация и систематика, и е добре разработена както за светлинен, така и за електронен микроскоп.

12. Лични впечатления

Единствените ми впечатления за Нина Джембекова са задочни – от представения дисертационен труд и от прочита на някой от нейните трудове. Те създават впечатление за акуратност, отлично познаване на материията и практическо приложение на знанията.

13. Препоръки за бъдещо използване на дисертационните приноси и резултати

Определено мога да заявя, че изследването има перспектива, има и още много възможности за работа. Бързите темпове на развитие на технологиите за секвениране вероятно ще позволят в бъдеще получаване на секвенции с по-голяма дължина, както и повишаване на качеството на базите данни (по-голям брой проверени секвенции, депозирани в международните нуклеоидни бази данни). Това ще позволи усъвършенстване на метагенетичния подход и прецизиране на получените данни и ще повиши неговата надеждност като метод за мониторинг на планктонните съобщества и по-специално на потенциално токсични видове. Получените резултати обуславят необходимостта от регулярен мониторинг и контрол на крайбрежните води, чрез интегриране на морфологични, генетични и токсикологични анализи.

14. Заключение

Представеният дисертационен труд и придружаващите го материали отговарят изцяло на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и съответния Правилник на ИО-БАН. Представените материали и дисертационни резултати напълно отговарят на изискванията за получаване на ОНС „доктор“. Постигнатите научни и научноприложни приноси са реални, използвани са съвременни методи на изследване, а темата на дисертацията е изключително актуална. Съществуват отлични перспективи за продължаване и развиване на този тип изследвания. С този труд ас. Джембекова показва високо ниво на професионална подготовка и се представя като изграден и мотивиран изследовател в областта на мониторинга на токсични видове и прилагането на молекуларни методи и техники в таксономията и екологията, с отлична методологична основа и добър подход на представяне на научните резултати.

Представените данни и факти ми дават основание да оценя ПОЛОЖИТЕЛНО дисертационният труд и да предложа на почитаемото научно жури ДА ПРИСЪДИ образователната и научна степен „доктор“ на **Нина Стойчева Джембекова** в област на висше образование: 4. Природни науки, математика, информатика, професионално направление 4.3. Биологически науки, докторска програма хидробиология.

27.08.2018 г.

Рецензент:

Проф. дбн Димитър Иванов