БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО ОКЕАНОЛОГИЯ „ПРОФ. ФРИТЬОФ НАНСЕН“

Нина Стойчева Джембекова

МОЛЕКУЛЯРНА ТАКСОНОМИЯ И ЕКОЛОГИЯ НА ПОТЕНЦИАЛНО ТОКСИЧНИ ФИТОПЛАНКТОННИ ВИДОВЕ В ЧЕРНО МОРЕ

АВТОРЕФЕРАТ

на ДИСЕРТАЦИЯ

за придобиване на образователна и научна степен

„ДОКТОР“

По област на висше образование шифър 4.
„Природни науки, математика и информатика“
Професионално направление шифър 4.3 „Биологически науки“
Докторска програма „Хидробиология”
Научно направление „Молекулярна таксономия на фитопланктонни видове от Черно море”

Научни ръководители:
проф. д-р Снежана Мончева ИО-БАН
доц. д-р Петя Иванова ИО-БАН

Варна
2018 г.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на разширен семинар на секция „Биология и екология на морето“ към Институт по океанология „Проф. Фритьоф Нансен“ на Българска академия на науките, състоял се на 25 юни 2018 г.

Дисертацията е разработена в рамките на редовна докторантура в секция „Биология и екология на морето“ към Институт по океанология – БАН.

Представеният дисертационен труд е с обем от 193 страници текст, съдържа 10 глави, 35 фигури, 17 таблици и 7 приложения. Списъкът с цитираната литература включва 461 заглавия, от които 51 на кирилица, 407 на латиница и 3 интернет страници.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 18.09.2018 г. от 14:00 ч. в заседателната зала на Институт по океанология при БАН на ул. „Първи май“ №40, на открито заседание на петчленно Научно жури в състав:

1. проф. д-р Снежанка Петрова Мончева (ИО-БАН)
2. проф. дбн Марияна Владимирова Филипова-Маринова
3. проф. дбн Димитър Асенов Иванов (ИБЕИ-БАН)
4. проф. дбн Иван Илиев Атанасов (Агробиоинститут)
5. доц. д-р Кремена Благовестова Стефанова (ИО-БАН)

Материалите по защитата са на разположение на интересуващите се в библиотеката на Института по океанология „Проф. Фритьоф Нансен“, Варна, ул. „Първи май“ №40.

I. УВОД

В последните няколко десетилетия проблемите, свързани с биотоксините, продуцирани от морски фитопланктонни видове, предизвикват все по-засилен интерес сред научната общност, държавните отговорни институции и обществеността. Морските водораслови токсини са едни от най-мощните в света и представляват реална опасност за общественото здраве, промишлените рибни ресурси и марикултура, различни представители на морската фауна и морските екосистеми като цяло, причинявайки огромни икономически загуби. Изключително тревожна е наблюдаваната в последните години глобална тенденция на увеличаване на случаите на токсични фитопланктонни цъфтежи (Anderson, 2007). Фитопланктонните цъфтежи са един от ключовите проблеми за състоянието на черноморската екосистема (Nesterova et al., 2008). Фитопланктонни видове, регистрирани като токсични в различни части на световния океан (Moestrup et al., 2009) са разпространени и в Черно море (Moncheva and Parr, 2015), като част от тях са доказано токсигенни (Vershinin and Kamnev, 2001; Vershinin et al., 2006; Morton et al., 2007, 2009; Besiktepe et al., 2008). За оценка на риска от формиране на токсични цъфтежи са необходими прецизна таксономична идентификация и задълбочено познание за специфичните екофизиологични особености на фитопланктонните видове и факторите, които провокират развитието им в морската среда (Anderson et al., 2012). Рутинните микроскопски методи за идентификация не винаги са достатъчно ефективни, предимно поради липсата на специфични таксономични белези или твърде малките им размери. Това ограничава мащаба на знанията за фитопланктонното разнообразие и структура, както и възможностите за управление на морските ресурси, застрашени от токсични явления. Необходимо е разработване на по-прецизни, усъвършенствани методи за идентификация (Janson and Hayes, 2006; Anderson et al., 2012) 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 (Danovaro et al., 2016).

Молекулярните методи предлагат иновативен подход за декодиране на морското микробиално биоразнообразие (Massana et al., 2015), с огромен потенциал при разработване на научно обосновани мониторингови програми от „ново поколение“ (Bourlat et al., 2013). В резултат на глобалният технологичен прогрес в молекулярните технологии, генетичните методи стават предпочитано средство за мониторинг на морското планктонно разнообразие и изясняване и прецизиране на систематиката, филогенията и популационната биология (Janson and Hayes, 2006). За разлика от другите морски басейни, Черно море остава все още недостатъчно проучено по отношение на генетичното биоразнообразие на протисти. Това налага прилагането на тези иновативни методи на регионално ниво за изследване на фитопланктонното биоразнообразие, за идентифициране на потенциално токсични видове и за оценка на състоянието на морската среда.

II. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

Прегледът на литературата тематично е разделен на пет части. Първата част представлява кратка физикохимична характеристика на българската акватория на Черно море. Във втората част е разгледан проблемът токсичен фитопланктон: вредни фитопланктонни цъфтежи - формиране и въздействия върху екосистемите, микроводораслови токсини и видове отравяния причинявани от тях. В третата част е направен обзор на потенциално токсичните фитопланктонни видове в Черно море. Разгледани са регистрираните токсини, продуцирани от черноморски популации. Молекулярните методи за изследване на токсични фитопланктонни видове са представени в четвърта част. Разгледани са различни подходи и тяхната приложимост за решаване на конкретни задачи. Обърнато е внимание на методите за изследване, които не изискват култивиране на фитопланктона, а позволяват директно изследване на видовете в естествени смесени проби. Петата част е фокусирана върху род *Pseudo-nitzschia*. Представени са представителите на рода в Черно море. Разгледана е токсичността на *Pseudo-nitzschia* в глобален мащаб. Направен е преглед на изследванията на зависимостта между факторите на средата и развитието и токсичността на рода в естествени и в лабораторни условия. Резюмирани са молекулярните маркери, използвани за изследване на видовете *Pseudo-nitzschia*.

Направеният литературен обзор показва, че въпреки изследванията проведени до момента, проблемът „токсичен фитопланктон“ в Черно море все още не е достатъчно проучен. Обоснована е необходимостта от едно по-задълбочено изследване на таксономията и екологията на черноморски изолати на потенциално токсичните микроводорасли, с прилагане на по-прецизни методи за идентификация.

III. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО

Целта на настоящия дисертационния труд е изясняване на таксономичната принадлежност на потенциално токсични фитопланктонни видове, представени в българската акватория на Черно море, чрез прилагане на молекулярни подходи, както и прецизиране на видовия състав на род *Pseudo-nitzschia* и проучване на аутекологичните му характеристики в локален мащаб.

Задачи:

1.Инвентаризация на потенциално токсичните фитопланктонни видове в българската акватория на Черно море и анализ на пространствено-времевата вариабилност в съвременните условия на базата на дългогодишни данни на ИО-БАН и литературни източници.

2. Проучване на зависимостта на качествения и количествен състав на потенциално токсичните видове от род *Pseudo-nitzschia* от някои екологични фактори на средата в българската акватория на Черно море.

3. Прилагане на метагенетичен подход за идентифициране на потенциално токсичните фитопланктонни видове в акваторията на Варненски залив и тестване на приложимостта му за извършване на целеви мониторинг в българската акватория.

4. Таксономична идентификация на представителите на род *Pseudo-nitzschia* във Варненски залив, чрез прилагане на родово специфични праймери.

Работна хипотеза:

Сред потенциално токсичните видове в черноморското фитопланктонно съобщество съществува неразкрито криптично биоразнообразие. Съвременните молекулярни методи за изследване на фитопланктона са иновативни подходи за изучаване на видовото разнообразие и разкриване на криптичните видове, и ще допринесат за подобряване на мониторинговите програми.

IV. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

IV.1. Пробонабиране

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 род *Pseudo-nitzschia* от някои екологични фактори на средата, са анализирани данни от фитопланктонни проби (502 за първата задача и 629 за втората) от 67 станции (хоризонти 0-100m), събирани в периода 1999 – 2014 година (Фигура1), по различни научно-изследователски проекти и задачи, предоставени от проф. д-р Снежана Мончева.

Фигура 1 Карта на станциите за фитопланктонните проби, анализирани в настоящото изследване за присъствие на потенциално токсични видове

За осъществяване на предвидените в настоящото изследване молекулярни анализи са събрани 20 проби от морска вода (хоризонт 0 m) в периода октомври 2013 – септември 2015. От тях са анализирани 20 проби за идентифициране на видовете от род *Pseudo-nitzschia* чрез родово-специфични праймери и 13 проби за метагенетичен мониторинг. Пробонабирането е извършвано в изкуствено създадения канал между Варненски залив и Варненско езеро (Фигура 2), като мястото е подбрано от една страна поради лесния достъп, позволяващ регулярно пробовзимане, а от друга, поради високата еутрофност на района и свързаната с това по-висока концентрация на развиващите се там фитопланктонни видове.

Фигура 2 Станция за пробонабиране на проби за генетична идентификация на потенциално токсични фитопланктонни видове

Между 350 и 1000 мл морска вода са филтрувани през нитроцелулозни филтри с размер на порите 3 µm и диаметър 25 mm (GE Healthcare UK Ltd) при налягане < 200 mmHg с помощта на филтрувална установка (Advantec) и вакуумна помпа (Millipore). Филтрите са поставяни в криоепруветки 2 ml (Nalgene, Sigma-Aldrich) и замразявани в течен азот до изолирането на ДНК

IV.2. Методи за изолиране на ДНК

За изолиране на ДНК е приложено CTAB изолиране (модифицирано по Doyle and Doyle, 1987), с изключение на четири проби, за които е използван търговски кит GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific).

IV.3. Полимеразна верижна реакция (PCR амплификация) и секвениране

IV.3.1. Метагенетични анализи

Полимеразна верижна реакция и 454 пиросеквениране:
За извършване на метагенетичен анализ, с използване на платформа за секвениране Roche 454, са избрани универсални праймери за амплифициране на V7–9 хипервариабилния регион на 18S rRNA ген**,** модифицирани по Nishitani et al. (2012). Секвенирането на ампликоните е извършено със секвенатор Roche 454 GS FLX+ (Roche Diagnostics, USA), съгласно протокол на производителя.

Полимеразна верижна реакция и MiSeq секвениране:
За извършване на метагенетичен анализ, с използване на платформа за секвениране MiSeq, са подбрани двойка универсални праймери, амплифициращи V4–5 хипервариабилния регион на 18S rRNA ген (Stoeck et al., 2010). Секвенирането е извършено с платформа за секвениране MiSeq 250PE (Illumina, USA).

IV.3.2. Идентификация на видовете от род *Pseudo-nitzschia* в смесени проби с използване на специфични праймери и секвениране на клонови библиотеки

Полимеразна верижна реакция:
За молекулярна идентификация на видове от род *Pseudo-nitzschia* в естествени смесени фитопланктонни проби е използван „гнездови“ PCR с последователно използване на универсални и родово специфични праймери (LSU rDNA) и секвениране на клонови библиотеки по McDonald et al. (2007). Секвенирането е извършено с Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer.

IV.4. Обработка и анализ на данните

IV.4.1. Морфологична таксономична обработка на пробите

Данните, използвани в глави V.1 и V.2 са базирани на таксономично морфологично определяне и количествен анализ, извършени с обърнат микроскоп на фиксирани проби, по стандартна методика (Moncheva and Parr, 2015).

IV.4.2. Анализ на съвременната тенденция в развитието на потенциално токсичните фитопланктонни видове в българската акватория на Черно море

Анализирани са количествените параметри – концентрация (cells L^{-1}) и биомаса (mg m^{-3}) на потенциално токсичните видове, идентифицирани в пробите, както и съотношението им към общата концентрация и биомаса на фитопланктона. Честотата на срещане на потенциално токсичните микроводорасли е изчислена чрез индекс на честота на срещане по Soyer (1970). Потенциалният риск от токсични явления е оценен чрез сравнителен анализ на максималната концентрация на потенциално токсичните видове, регистрирана в района и концентрацията, при която същите видове са съобщени при установени токсични явления в други райони на Черно море.

IV.4.3. Анализ на зависимостта между някои физико-химични фактори на средата тенденция и развитието на потенциално токсични диатомеи от род *Pseudo-nitzschia* в българската акватория на Черно море

За анализ на развитието на род *Pseudo-nitzschia* в Черно море е изчислено процентното представяне на отделните видове *Pseudo-nitzschia* в българската акватория. Разгледано е вертикалното разпределение на видовете. Обобщени са дългогодишни литературни данни за цъфтежни явления на рода. Анализирани са данни за съпътстващите фактори на средата – температура, соленост, концентрация на биогенни елементи (NH_4, NO_3, PO_4, Si). Изведени са температурен и солеви диапазон на срещане на представителите на рода в български води. За оценка на функционалните зависимости между факторите на средата и развитието на *Pseudo-nitzschia* е

приложена статистическа обработка на данните - регресионен анализ (Microsoft Excel – MS Office Professional Plus 2010).

IV.4.4. Обработка на данните от масово паралелно секвениране, подбор и таксономична идентификация на оперативните таксономични единици

Биоинформатичните и статистически анализи са извършени в Изследователски център по биоинформатика и бионауки, Йокохама, Япония с използване на SILVA release (Quast et al., 2013), Mothur, Claident (Tanabe, 2012a), Assams-assembler (Tanabe, 2012b), BLAST search (Cheung et al., 2010), програма R (R Development Core Team, 2014).

IV.4.5. Обработка на данните, получени при секвенирането на клонови библиотеки за молекулярна идентификация на видове от род *Pseudo-nitzschia* в естествени смесени фитопланктонни проби

За съпоставяне на получените секвенции е използван софтуерен пакет MEGA7 (Kumar et al., 2016). Химерните и единично представените секвенции са премахнати от базата данни. Таксономичната принадлежност на всеки риботип е установена чрез BLAST search, спрямо базата данни GenBank и причислена към вида с най-добро съвпадение. Изчислено е покритието на всяка клонова библиотека (Romari and Vaulot, 2004). Генетичното разнообразие между пробите (Hd) е изчислено с помощта на софтуерния продукт DNAsp (Librado and Rozas, 2009). За извършване на филогенетичните анализи, LSU секвенции на някои видове от род *Pseudo-nitzschia* са изтеглени от GenBank и добавени към използваната база данни.

V. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

V.1. Съвременна тенденция в развитието на потенциално токсичните фитопланктонни видове в българската акватория на Черно море (инвентаризация на дългогодишни бази данни)

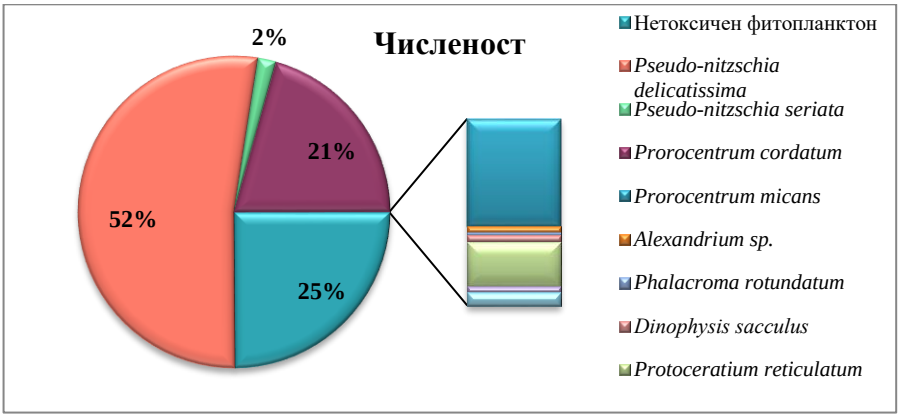
Дългогодишният ред от данни (1999-2014г.) на база морфологичен таксономичен анализ, разкрива присъствие на 28 потенциално токсични фитопланктонни вида по българския бряг. С най-голям брой видове е представен клас Dinophyceae (19 вида), следван от Bacillariophyceae (4 вида), Cyanophyceae (3 вида), Prymnesiophyceae и Raphidophyceae (представени с по 1 вид). Изчислен е индекса на честота на срещане (Таблица 1).

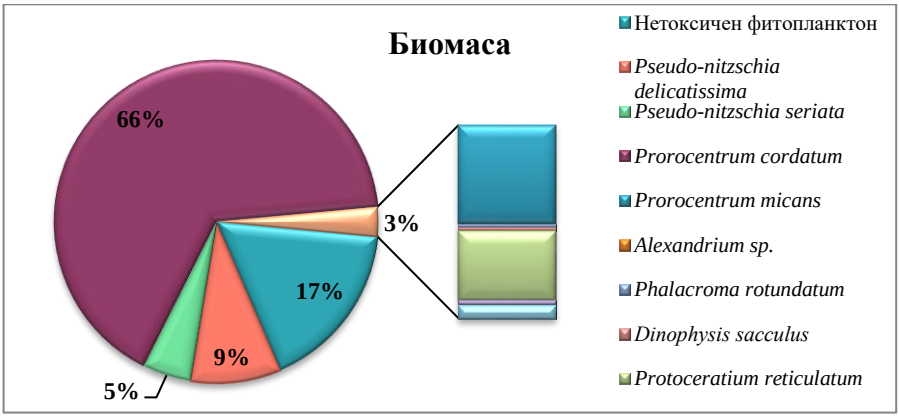
Таблица 1 Индекс на честота на срещане на потенциално токсичните фитопланконни видове в българската акватория на Черно море

Вид	Клас	Индекс
Alexandrium sp.	Dinophyceae	81
Alexandrium minutum	Dinophyceae	1
Alexandrium monilatum	Dinophyceae	3
Alexandrium ostenfeldii	Dinophyceae	0
Alexandrium tamarense	Dinophyceae	1
Amphidinium operculatum	Dinophyceae	1
Aphanizomenon flos-aquae	Cyanophyceae	0
Anabaena sp.	Cyanophyceae	1
Dinophysis acuminata	Dinophyceae	**29**
Dinophysis caudata	Dinophyceae	**26**
Dinophysis fortii	Dinophyceae	9
Dinophysis tripos	Dinophyceae	1
Dinophysis acuta	Dinophyceae	**17**
Dinophysis sacculus	Dinophyceae	**26**
Gonyaulax spinifera	Dinophyceae	62
Lingulodinium polyedrum	Dinophyceae	53
Heterosigma akashiwo	Raphidophyceae	2
Microcystis sp.	Cyanophyceae	1
Phalacroma rotundatum	Dinophyceae	54
Prorocentrum cordatum	Dinophyceae	93
Prorocentrum micans	Dinophyceae	73
Protoceratium reticulatum	Dinophyceae	51
Protoperidinium crassipes	Dinophyceae	7
Prymnesium sp.	Prymnesiophyceae	1
Pseudo-nitzschia delicatissima	Bacillariophyceae	79
Pseudo-nitzschia pungens	Bacillariophyceae	3
Pseudo-nitzschia seriata	Bacillariophyceae	42
Pseudo-nitzchia pseudodelicatissima	Bacillariophyceae	1

F = % 1-15 **Рядък** F = % 16-40 **Често срещан**
F = % 41-60 **Обичаен/Типичен** F = % 61-100 **Постоянно представен**

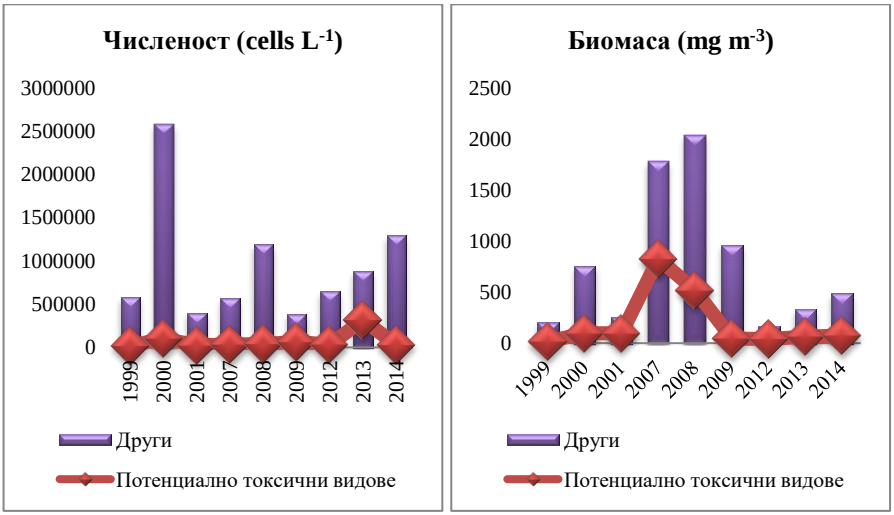
Получените данни потвърждават дългогодишния модел на постоянно присъствие и развитие до цъфтежни концентрации на три от най-типичните за българското крайбрежие на Черно море потенциално токсични видове (*P. delicatissima*, *P. seriata*, *P. cordatum*). Регистрирано е тотално доминиране на потенциално токсичните видове (11 вида) във фитопланктонното съобщество през юни 2012 г., достигайки 75% от общата численост и 83% от общата биомаса (Фигура 3).





Фигура 3 Процентно съотношение на потенциално токсичните видове, представени във фитопланктонното съобщество през юни 2012 (станция 32)

Наблюдава се сравнително постоянна тенденция в развитието на потенциално токсичните видове по българското крайбрежие с нерегулярни пикове в числеността и биомасата на типичните цъфтежни видове, предимно в резултат на присъствие на динофлагелати от по-висок размерен клас (Фигура 4). Не са наблюдавани значителни годишни разлики във видовия състав, с изключение на „редките“ видове, които са регистрирани спорадично.

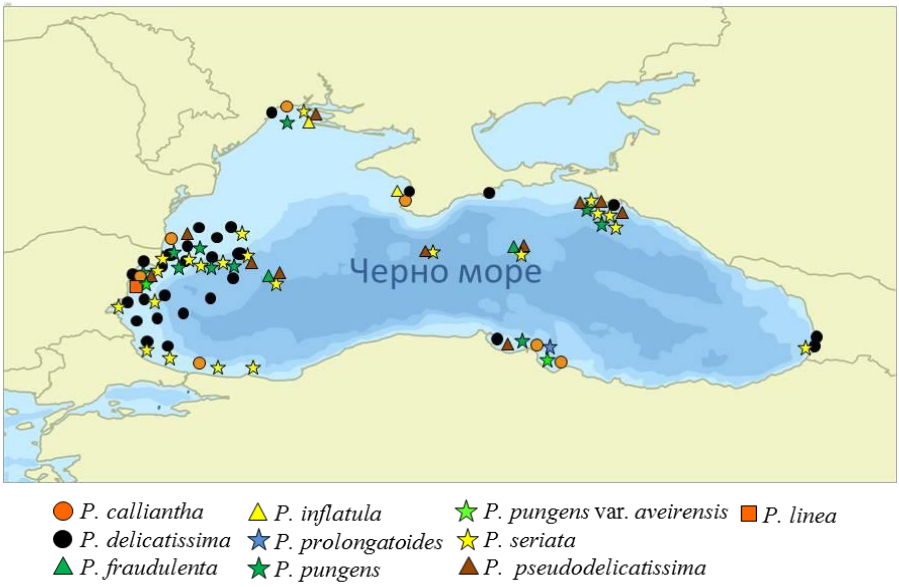


Фигура 4 Годишен тренд на потенциално токсичните видове в станция 32 по години

Въпреки, че потенциално токсичните микроводорасли не достигат висока численост (с изключение на типично цъфтежните видове), концентрациите им многократно надвишават тези, при съобщените случаи на токсичност в други райони на Черно море (*Alexandrium tamarense* - 6.5 пъти по-високи; *Dinophysis caudata* - 23 пъти по-високи; *Gonyaulax spinifera* - 30 пъти по-високи; *Lingulodinium polyedrum* - 28 пъти по-високи; *Phalacroma rotundatum* - 29 пъти по-високи).

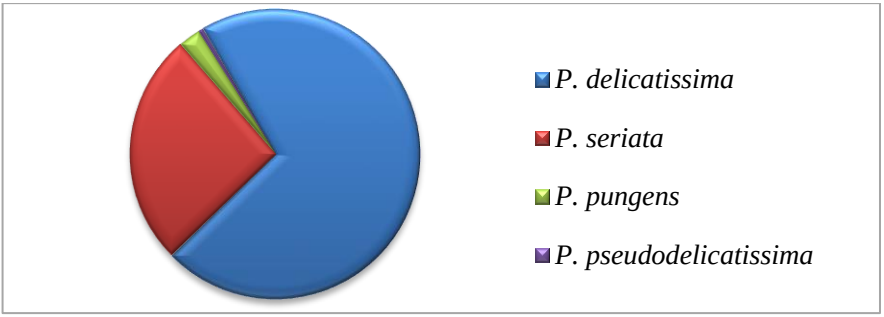
V.2. Качествен и количествен състав на потенциално токсичните диатомеи от род *Pseudo-nitzschia* в българската акватория на Черно море и зависимост от някои физико-химични фактори на средата

Установено е, че *Pseudo-nitzschia* е типичен за Черно море род, като някои видове като *P. delicatissima* и *P. seriata* са регистрирани по бреговете на всички черноморски държави, а други са идентифицирани само в отделни локации - *P. inflatula* е идентифициран само в украински води, *P. prolongatoides* само в турски води, а *P. linea* само в българската акватория (Фигура 5). Интересен е въпросът дали наистина съществува регионална видова специфичност или различията се дължат на ограничената резолюция на морфологична идентификация и липсата на задълбочени изследвания на видовия състав с по-прецизни методи.



Фигура 5 Карта на разпространението на видовете от род *Pseudo-nitzschia* в Черно море

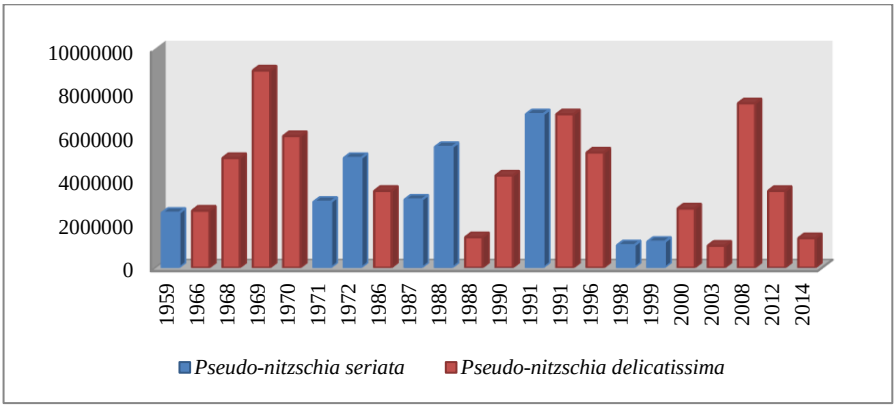
Анализираните в настоящото изследване данни, потвърждават присъствието на четири потенциално токсични представители на род *Pseudo-nitzschia* (Фигура 6).



Фигура 6 Процентно разпределение на видовете от род *Pseudo-nitzschia* в анализираните проби

Pseudo-nitzschia delicatissima е най-характерния представител на рода в българската акватория, установен в 71% от морфологично изследваните проби. Видът е представен във водния стълб през цялата година (температурно-солеви диапазон 7.35-27.18°C; 6.7-20.09‰), с изразена по-висока численост през пролетно-летния период, предизвиквайки периодични цъфтежи. *P. seriata* е регистриран в 26% от пробите, представен с най-високи концентрации през месеците май, юни и август (при температури и соленост в диапазона 18.83 – 25.76°C и 14.78 – 17.02‰), съпътствайки бурното развитие на *P. delicatissima*, но е регистриран и в проби от останалия период на изследване, с изключение на месец април. Другите два вида, представящи рода (*P. pungens* и *P. pseudodelicatissima*) са наблюдавани като незначителен компонент от популацията на *Pseudo-nitzschia*. *P. pungens* е най-добре представен през септември (t = 21.36 – 24.27°C; соленост 15.85 – 17.75‰), но с максимална концентрация през ноември (при t = 15.19°C и соленост = 17.71‰.). *P. pseudodelicatissima* е идентифициран само в две проби (t = 19.96°C и 20.46°C; соленост 17.34 ‰ и 17.77).

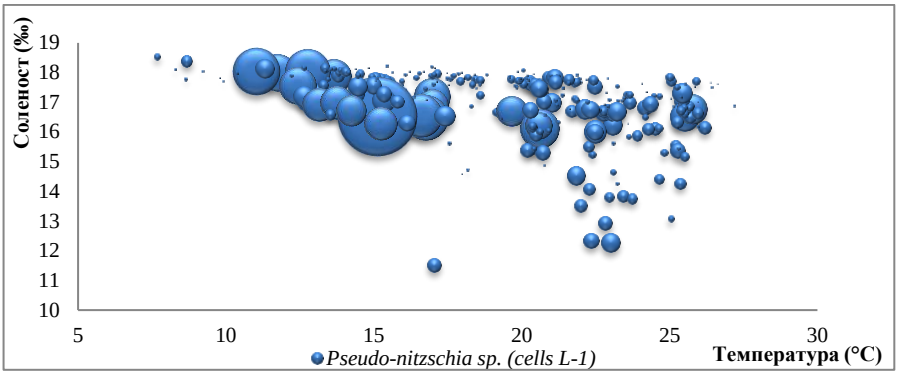
Дългосрочните литературни данни показват наличие на постоянни цъфтежни явления на *Pseudo-nitzschia* (*P. delicatissima* и *P. seriata*) по българското крайбрежие (Фигура 7).



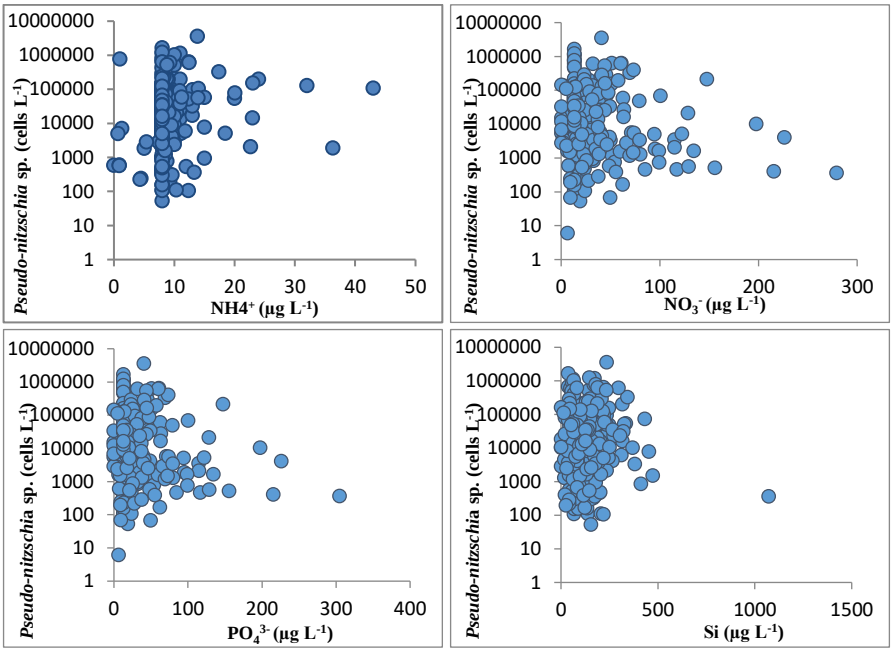
Фигура 7 Многогодишна динамика на цъфтежни концентрации на *Pseudo-nitzschia* (cells L^{-1}) по българския бряг на Черно море по Moncheva et al., 1997; Petrova et al., 2007, 2011

Във вертикално отношение, *Pseudo-nitzschia* spp. са разпределени в целия воден стълб в диапазона 0 – 88 m, с най-висока численост в повърхностните слоеве до 17 m дълбочина, в станциите, подложени на антропогенно въздействие. В най-дълбоководните проби (> 90 m) родът не е регистриран.

Анализирът на разпределението на *Pseudo-nitzshia* в българската акватория в зависимост от някои физико-химичните параметри на средата не показва статистически значима връзка при директно съпоставяне на числеността на *Pseudo-nitzschia* и стойностите на различни параметри на средата: температура (r = 0.001), соленост (r = -0.153), амониев азот (NH_4; r = 0.04), нитратен азот (NO_3; r =0.05), нитритен азот (NO_2; r = 0.006), общ азот (N; r = 0.07), фосфатен фосфор (PO_4; r = 0.04), общ фосфор (P; r = 0.03), силиций (Si; 0.05) (Фигура 8 и 9).



Фигура 8 Зависимост между численост на *Pseudo-nitzschia* (cells L^{-1}) и температура (°C) и соленост (ppt). Големината на кръговете отразява концентрацията на клетките



Фигура 9 Зависимост между числеността *Pseudo-nitzschia* и концентрацията на амоний, нитрати, фосфати и силиций в българската акватория

Установеният широк температурен и солеви диапазон (7.3 – 27.2°C и 6.7 и 20.1 ‰) на срещане на *Pseudo-nitzschia* в българската акватория, показва високия потенциал за адаптиране на локалните естествените популации.

Липсата на статистически значима връзка между изследваните физико-химични параметри и концентрацията на *Pseudo-nitzschia*, не позволява извеждането на корелационна зависимост. Необходими са мултипараметрични изследвания в лабораторни и в естествени условия върху развитието на *Pseudo-nitzschia* и продуцирането на домоена киселина за изясняване на факторите, промотиращи токсични цъфтежи на *Pseudo-nitzschia* в локален мащаб.

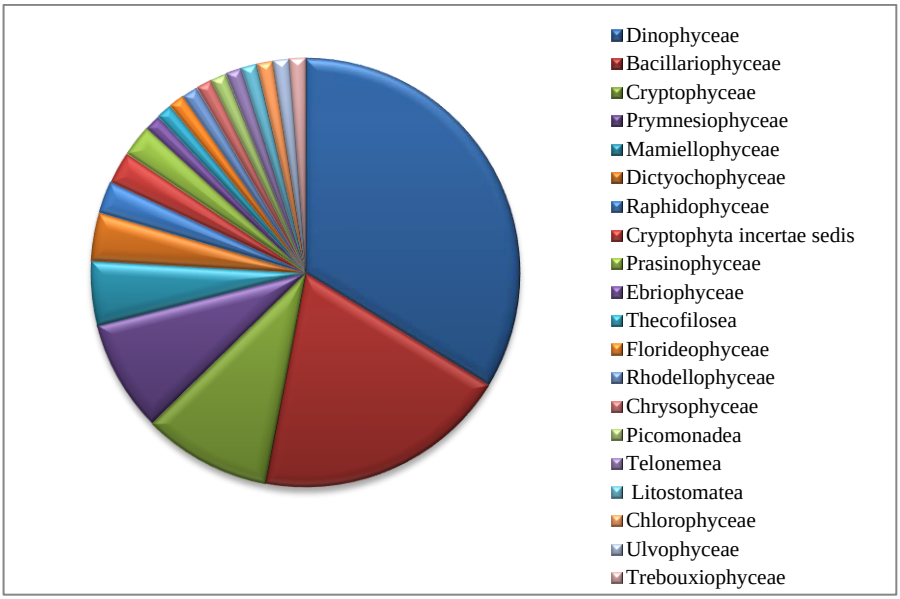
V.3. Метагенетичен мониторинг на потенциално токсични видове фитопланктон във Варненски залив

V.3.1 Пиросеквениране с Roche 454

От извършения анализ чрез прилагане на 454 пиросеквениране на V7–9 хипервариабилния регион на 18S рРНК ген са са получени между 6,248 и 57,941 секвенции (20,692±16,027). Общият брой регистрирани оперативни таксономични единици е 469, като в отделните проби варира между 84 и 196 (134±34). Значителен дял от секвенциите (70%) показват високо сходство с референтни секвенции (>99%).

Разпределението на OTUs по супергрупи показва доминиране на Alveolata (36%) [26-42%], следвана от Opisthokonta (21%) [11-28%], Stramenopiles (17%) [13-24%], Rhizaria (12%) [3-23%], Hacrobia (8%) [7-15%], Viridiplantae (5%) [1-7%], некласифицирани (1%) и Archaeplastida и Centroheliozoa под 1%.

Идентифицирани са 83 микроводораслови таксона със съответствие над 0.990, от които 73.5% определени до ниво вид. Най-много видове принадлежат към клас Dinophyceaea (28 вида, 33.7% от общия брой), следвани от кремъчните водорасли – Bacillariophyceae (16 вида, 19.28% от общия брой), Cryptophyceae (8 вида, 9.6%), Prymnesiophyceae (7 вида, 8.4%), Mamiellophyceaea (4 вида, 4.8%), Dictyochophyceae (3 вида, 3.6%) и останалите представени с по 1 или 2 вида (Фигура 10).



Фигура 10 Процентно таксономично разпределение по класове на идентифицираните до видово ниво OTUs, показващи над 99% сходство

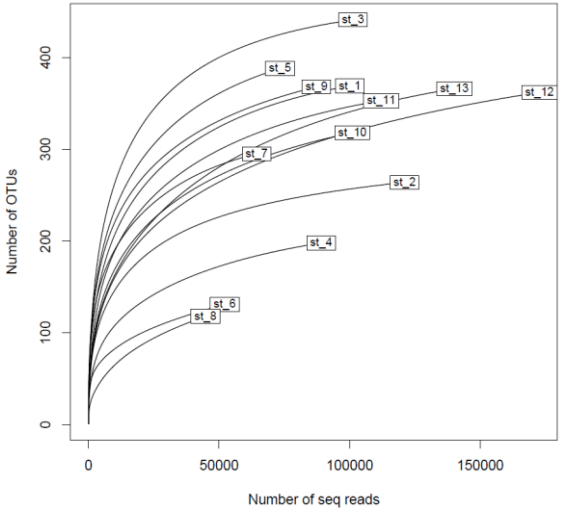
Установени са както видове неописани пред българския бряг, така и такива, които липсват изцяло от таксономичния списък на фитопланктона в Черно море. 10 оперативни таксономични са отнесени към потенциално токсичния фитопланктон. От тях 7 са ясно идентифицирани на ниво вид - *Gonyaulax spinifera*, *Lingulodinium polyedrum*, *Heterosigma akashiwo*, *Pfiesteria piscicida* (не е регистриран в Черно море), *Karlodinium veneficum* (не е регистриран в българската акватория), *Prorocentrum cordatum*, *Gymnodinium catenatum*.

Установеното високо междувидово генетично сходство при някои потенциално токсични фитопланктонни родове (*Prorocentrum*, *Alexandrium*, *Pseudo-nitzschia*) затруднява интерпретацията на резултатите на ниво вид.

V.3.2 MiSeq

От извършения анализ чрез прилагане на MiSeq секвениране на V4–5 хипервариабилния регион на 18S рРНК ген са са получени между 44,778 и 172,635 (96 837 ± 35 295) секвенции. Установени са общо 1154 оперативни таксономични единици (OTUs), вариращи в пробите между 123–463 (320 ± 107).

Зависимостта между броя получени секвенции (MPSs) и оперативните таксономични единици (OTUs) за различните проби показва, че секвенционните рийдове, необходими за детекция на повечето оперативни таксономични единици, присъстващи в пробите, варират между около 50 000 и 170 000 (Фигура 11).



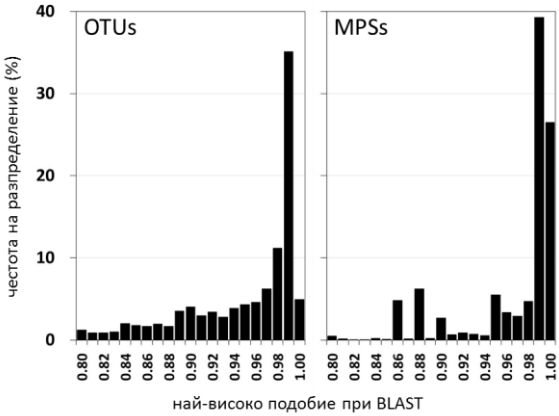
Фигура 11 Криви на разреждане, демонстриращи зависимостта между броя на секвенционните прочити и установените в пробите OTUs

Сравнителното разпределение на получените секвенции и оперативни таксономични единици на ниво супергрупа показва, че Alveolata се характеризира с най-голяма численост през изследвания период,следвана от Stramenopiles, Opisthokonta, Rhizaria, Viridiplantae и Hacrobia (Фигура 12).

MPS **OTU**

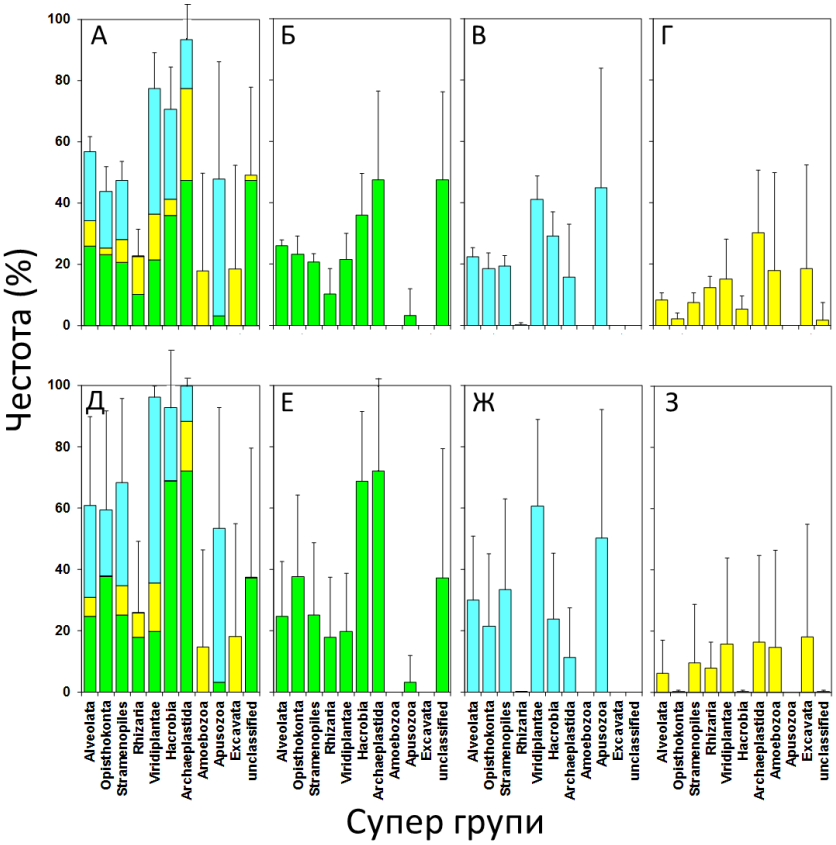
Фигура 12 Сравнително разпределение на общия брой MPS и OTUs в анализираните проби на ниво супергрупи

При съпоставяне на честотата на разпределение и сходството, демонстрирано при прилагане на BLAST search, 40.0 % от данните (брой OTUs) показват 0.990–1.000 като най-добър резултат с референтни секвенции, депозирани в международните нуклеотидни бази данни, а 51.2 % имат сходство >0.980, докато по отношение на брой получени секвенции (MPSs) 65.7 % демонстрират 0.990–1.000 за най-добър резултат с референтни секвенции, а 70.4 % са с подобие над >0.980 (Фигура 13).



Фигура 13 Честота на разпределение според най-високите наблюдавани резултати за сходство с референтни секвенции, депозирани в INSDs при прилагане на BLAST search

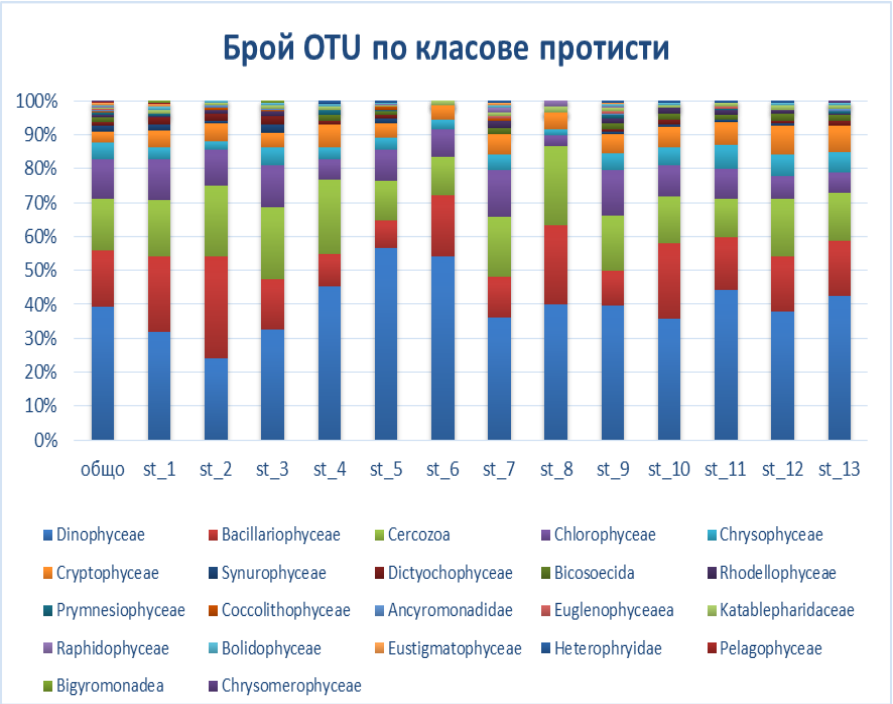
За оценка на настоящата способност за таксономична идентификация с използване на 18S rRNA gene (V4–5 region) е анализирано разпределението на таксономичните единици и секвеници, идентични с референтни секвенции от INSDs (>0.990 BLAST top hit similarities) за всяка супергрупа (Фигура 14).



Фигура 14 Честота на разпределение на получените OTUs и MPSs по супергрупи

■ идентифицирани като конкретен вид; ■ с еднаква идентичност с повече от един вид; ■ идентифицирани като sp.

Установени са 242 OTUs, показващи сходство >0.990 със секвенции на протисти при BLAST search (21.3 % от всички регистрирани OTUs). Голяма част от тях (175 OTUs = 72.3 %) са идентифицирани на ниво „вид“, включвайки видове, които не са били регистрирани в български води по-рано. Установен е значителен брой хетеротрофни цилиати, с доминиращи сред протистите таксони *Strombidium*, *Tintinnopsis* и *Cyclotrichium*, добре представени в Черно море (Kurilov and Gavrilova, 2015). В допълнение са регистрирани и някои представители на Cercozoa (напр. *Ebria tripartita*, *Mataza hastifera*, *Protaspis grandis*) (Фигура 15).



Фигура 15 Разпределение на OTUs по класове протисти

Сред микроводораслите са определени 143 оперативни таксономични единици, голяма част от които идентифицирани на видово ниво (121 OTUs = 84.6 %). Най-голямо видово разнообразие е установено при клас Dinophyceaea (77 OTUs, съставящи 31.8 % от регистрираните видове протисти и 63.6 % от регистрираните фитопланктонни видове), с доминиращи представители от род *Gyrodinium* и *Heterocapsa*. Успоредно с типични за българската акватория видове, като *Heterocapsa rotundata*, *H. triquetra* и *Gyrodinium fusiforme*, са регистирани и нови таксони, като *Biecheleria cincta*, *Gymnodinium dorsalisulcum*, *Gyrodinium dominans*, *G. gutrula* и *Pelagodinium beii*. При диатомеите, основните оперативни таксономични единици също принадлежат както на видове, регистирани по-рано в български води при морфологично базирани изследвания (*Cerataulina pelagica*, *Rhizosolenia delicatula* и *Thalassiosira anguste-lineata*), така и такива, които по-рано не са наблюдавани там (*Chaetoceros calcitrans*, *Cyclotella atomus* и *Thalassiosira lundiana*). Chrysophyceae, Chlorophyceae и Cryptophyceae също са добре представени, включвайки новорегистрирани видове. В допълнение са определени някои пикопланктонни таксони, като *Bathycoccus*, *Micromonas*, *Nannochloris*, *Ostreococcus* и *Picomonas*.

Предвид спецификата на района на изследване, не е изненадващо регистрирането и на някои сладководни микроводораслови видове, като *Chlamydomonas raudensis*, *Cyclotella atomus*, *Cyclotella striata* и *Dilabifilum arthropyreniae*.

В изследваните проби са установени 12 потенциално токсични вида, недвусмислено идентифицирани на видово ниво, докато при няколко оперативни таксономични единици видовата идентификация е невъзможна, поради еднакво подобие с два или повече вида или максимално сходство с референтна секвенция идентифицирана до род (Таблица 2).

Таблица 2 Потенциално токсични видове, установени в изследваните проби

* Black Sea phytoplankton check-list in Moncheva and Parr 2015

Вид	**Разпростр. в Черно море***	**Брой проби, в които е регистр.**
Alexandrium ostenfeldii (Paulsen) Balech & Tangen, 1985	BG, GE, RO, RU, UA	2
Alexandrium sp.		10
Cochlodinium polykrikoides Margalef, 1961	BG, RU, UA	1
Dinophysis sp.		6
Gonyaulax spinifera (Claparède & Lachmann) Diesing, 1866	BG, GE, RO, RU, TR, UA	10
Karenia bidigitata Haywood & Steidinger, 2004	-	11
Karlodinium veneficum (D.Ballantine) J.Larsen, 2000	-	8
Lingulodinium polyedrum (F.Stein) J.D.Dodge, 1989	BG, GE, RO, RU, TR, UA	4
Pfiesteria piscicida K.A.Steidinger & J.M.Burkholder, 1996	-	8
Pheopolykrikos hartmannii (Zimmerman) Matsuoka & Fukuyo, 1986	BG, UA	1
Prorocentrum sp.		13
Protoceratium reticulatum (Claparède & Lachmann) Bütschli, 1885	BG, GE, RO, RU, TR, UA	2
Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima (Hasle) Hasle, 1993	BG, RU, TR, UA	9
Pseudo-nitzschia pungens (Grunow ex Cleve) G.R.Hasle, 1993	BG, RU, TR, UA	1
Pseudo-nitzschia sp.		2
Heterosigma akashiwo (Y.Hada) Y.Hada ex Y.Hara & M.Chihara, 1987	BG, RU	7

Настоящата разработка представлява пръв опит за изследване на еукариотното фитопланктонно разнообразие и по-специално мониторинг на потенциално токсичните видове в българската акватория на Черно море с прилагане на високоефективно секвениране от ново поколение. Молекулярният подход предлага различен поглед върху микробиалното разнообразие. Резултатите показват, че метагенетичният анализ и по-специално платформата от следващо поколение MiSeq притежава огромен потенциал за анализ на биоразнообразието на планктонното съобщество, разкривайки присъствие на значителен брой таксони. Това позволява идентифициране на видове, несъбщавани по-рано в Черно море, в това число и потенциално токсични такива. По-специално внимание трябва да се обърне на дребноразмерните видове, както и тези с недостатъчни или неясни морфологични белези, които много трудно могат да бъдат прецизно определени под микроскоп, особено при рутинните мониторингови програми. Методът дава възможност за създаване на регионална база данни и допълване на международните генетични бази данни. Успоредно с това, подходът има и своите ограничения, които трябва да се отчитат при прилагането му (Collins and Cruickshank, 2013). От една страна не се получават точни количествени данни, а от друга, генетичните анализи не могат да определят жизнения стадий на развитие на клетката, а улавянето на извънклетъчна ДНК (Kloos et al., 1994; Choi et al., 2004) също може да доведе до изопачаване на реалната численост. Фундаментален проблем при метагенетичните анализи е таксономичната идентификация на ДНК фрагментите, получени от смесени естествени проби, като идентификационната точност има директно влияние върху сравняване на биоразнообразието и интерпретацията на данните (Bazinet and Cummings, 2012; Tanabe et al., 2015; de Cárcer et al., 2016; Nagai et al., 2016a, 2016b). При метагенетичните изследвания таксономичната прецизност е ограничена основно от резолюцията на маркерния ген, покритието на праймерите, както и наличието на секвенции (в т.ч. и тяхното качество), депозирани в генетичните бази данни. Изборът на региона трябва да се определя от таргетната група организми и наличните бази данни, като за анализ на цялото съобщество на различни таксономични нива, V4 и V9 демонстрират съизмерими резултати (Pirreda et al., 2017; Tragin et al., 2018). Към настоящия момент метагенетичният подход за мониторинг на морски фитопланктон може да намери своето приложение като допълнение към класическите морфологични методи. Бързите темпове на развитие

на технологиите за секвениране обаче 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, превръщайки го в предпочитан метод за мониторинг на планктонните съобщества и по-специално потенциално токсичните видове.

V.4. Молекулярна идентификация на видове от род *Pseudo-nitzschia* в естествени смесени фитопланктонни проби (чрез секвениране на D1-D3 участък от LSU на клонови библиотеки и филогенетичен анализ)

Прилагането на традиционни морфологични техники за идентификация на род *Pseudo-nitzschia* на видово ниво среща редица затруднения, правейки ги неподходящи за програмите за мониторинг на потенциално токсичен фитопланктон. В тази връзка молекулярните технологии имат голям потенциал за подпомагане на тези програми и прецизиране на получените данни. От проведения молекулярен анализ са получени 20 клонови библиотеки, в които от 403 полезни секвенции са разграничени 4 различни LSU генотипа. От общо 868 получени секвенции 465 (53.57%) са отчетени като недостатъчно надеждни и не са използвани за последващ анализ (напр. секвенции със значителна разлика в дължината, секвенции с лошо качество, както и такива, срещащи се еднократно в библиотеките, обхващащи значителен дял от неизползваните секвенции). Въпреки високия процент премахнати от анализите секвенции, степента на покритие на всяка клонова библиотека е сравнително висока - варираща между 63 и 97% (средно 87%), кореспондирайки с резултатите, получени при прилагане на този подход в други басейни (McDonald et al., 2007; Ruggiero et al., 2015). Генетичното разнообразие в пробите варира между 0.000 и 0.727 (Таблица 3), значително по-ниско от описаното в Средиземно море (Ruggiero et al., 2015).

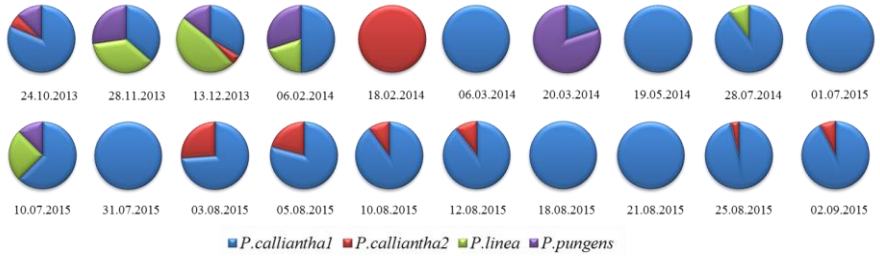
Таблица 3 Общ преглед на секвенциите на *Pseudo-nitzschia* от клоновите библиотеки, получени при настоящото изследване
Дата = дата на пробовземане; N = брой полезни секвенции; Nh = брой установени риботипове; Hd = генетично разнообразие; C = покритие; Cells L^{-1}= численост (LM)

Дата	N	N_h	H_d	C	Cells L^{-1}
24 октомври 2013 г.	16	3	0.342	88%	$2.05x10^6$
28 ноември 2013 г.	11	3	0.727	73%	$1.0x10^5$
13 декември 2013 г.	21	4	0.671	81%	-
06 февруари 2014 г.	10	3	0.536	70%	-
18 февруари 2014 г.	24	1	0.000	96%	-
06 март 2014 г.	34	1	0.000	97%	-
20 март 2014 г.	5	2	0.400	60%	0
19 май 2014 г.	33	1	0.000	97%	$1.8x10^6$
28 юли 2014 г.	20	2	0.189	90%	-
01 юли 2015 г.	19	1	0.000	95%	-
10 юли 2015 г.	8	3	0.607	63%	-
31 юли 2015 г.	13	1	0.000	92%	-
03 август 2015 г.	23	2	0.403	91%	-
05 август 2015 г.	24	2	0.344	92%	-
10 август 2015 г.	20	2	0.189	90%	-
12 август 2015 г.	19	2	0.209	89%	-
18 август 2015 г.	19	1	0.000	95%	-
21 август 2015 г.	32	1	0.000	97%	-
25 август 2015 г.	26	2	0.077	92%	-
02 септември 2015 г.	26	2	0.148	92%	-

Установените риботиповете показват 100% идентичност с референтни секвенции на три вида *Pseudo-nitzschia* в международната генетична база данни - *P. calliantha, P. linea* и *P. pungens* var. *aveirensis*. *P. calliantha* не е регистриран в българската акватория, но е докладван в други черноморски райони, *P. linea* не е идентифициран досега в черноморски проби и *P. pungens* var. *aveirensis* е вариететна форма,

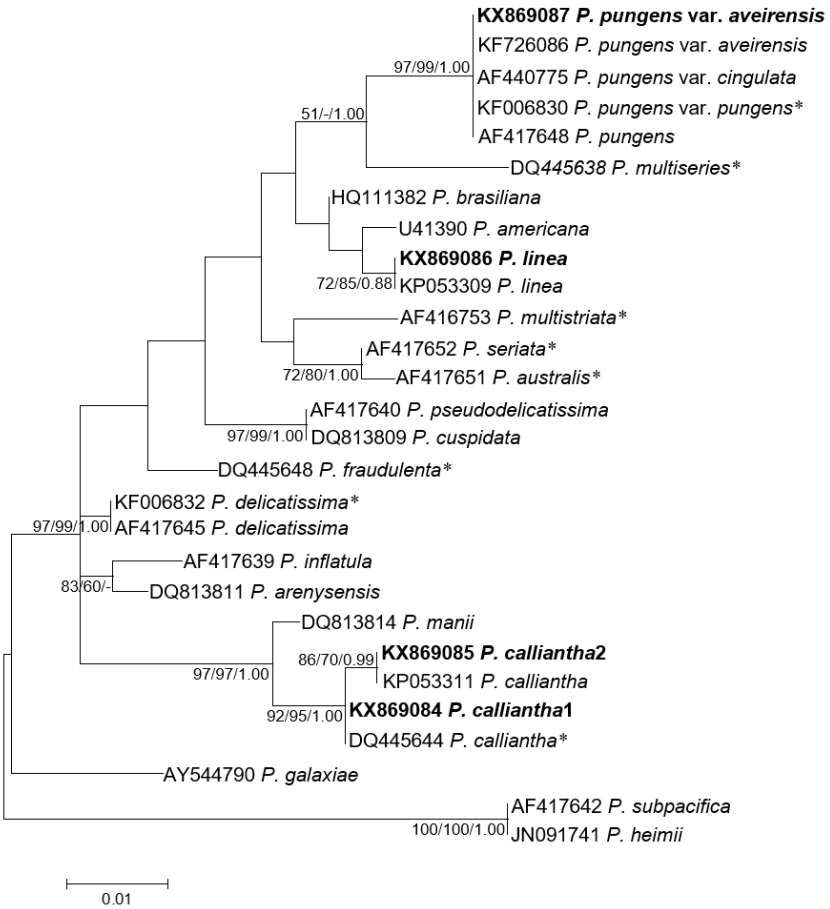
установявана досега само в турски води. Това са първите генетични данни за *Pseudo-nitzschia* от българската акватория на Черно море, като секвенциите са депозирани в международната генетична база данни.

Разпределението на установени риботипове в клоновите библиотеки е хетерогенно, като доминиращ е *P. calliantha*1 (80% от общия брой полезни секвенции), представен във всички клонови библиотеки, следван от *P. calliantha*2 (11% от общия брой полезни секвенции) – 9 проби, *P. pungens* var. *aveirensis* (4% от общия брой полезни секвенции) – 6 проби и *P. linea* (5% от общия брой полезни секвенции) - 5 проби (Фигура 16).



Фигура 16 Процентно разпределение на отделните риботипове Pseudo-nitzschia по клонови библиотеки

Молекулярните данни, получени при настоящото изследване, са комбинирани със секвенции, депозирани в международната генетична база данни GenBank (общо 28 LSU rDNA секвенции на 19 вида и 3 вариететни форми *Pseudo-nitzschia*) за филогенетичен анализ (Фигура 17).



Фигура 17 Филогенетично дърво, получено чрез Maximum Likelihood (ML) анализ на Pseudo-nitzschia spp. на база D1-D3 LSU rDNA. Показано е дървото с най-висок log likelihood (-811.77). Стойностите на възлите съответстват на bootstrap стойностите от MP (1000 replicates), likelihood (K2+G+I модел; 1000 replicates of bootstrap) и Bayesian (PP), като само стойностите > 50, респективно > 0.50 са показани. Таксоните маркирани с удебелен шрифт обозначават секвециите, получени в настоящото изследване, а изолатите, отбелязяни със * са токсични. Номерът преди името на вида означава номер за достъп до секвенцията в Genebank.

Настоящото изследване е опит за първи път да се анализира генетичното разнообразие на *Pseudo-nitzschia* в българската акватория на Черно море. Въпреки, че са идентифицирани само три вида, резултатите потвърждават предимствата на молекулярния подход с използване на специфични праймери, позволяващ по-висока резолюция и чувствителност за видова идентификация на *Pseudo-nitzschia* в естествени проби, в сравнение с класическото светлинно микроскопиране, добавяйки нови видове, вариетети и риботипове, които по-рано не са били откривани там. От друга страна генетичната връзка на нашите изолати със същите таксони от други географски райони потвърждава глобалното разпространение на тези видове. Наличието на видове, съобщавани по-рано в Черно море (Terenko and Terenko, 2012), но неустановени в настоящото изследване, предполага установяване на по-голямо генетично разнообразие при прилагане на молекулярния подход за по-обстойно изследване на рода. От друга страна докладваното видовото разнообразие на рода в Черно море е много по-бедно в сравнение с установеното в Средиземно море (Quijano-Scheggia et al., 2010; Moschandreou et al., 2012; Ruggiero et al., 2015), поставяйки въпроса дали разликата в солеността е основната причина за този факт или има и други фактори, които въздействат в тази посока. Специфичните условия на средата в Черно море вероятно са и фактор, влияещ върху отсъствието на мащабни токсични явления от местни изолати на *Pseudo-nitzschia*. Но са възможни и други причини (например клоново специфични генетични различия). Поради това е необходимо извършване на задълбочено генетично изследване на местните популации и лабораторен скрининг на токсичността им. Молекулярните методи са обещаваща иновация за изследване на таксономията, биогеографията и функционалното разнообразие на *Pseudo-nitzschia*. Паралелното изучаване на морфология, генетика и токсичност в естествени и лабораторни условия ще внесе яснота по отношение на разнообразие, екология и физиология на потенциално токсичния род в Черно море.

VI. ОБОБЩЕНИ РЕЗУЛТАТИ И ИЗВОДИ

1. Въз основа на анализиран морфологично базиран масив от данни (1999-2014) е оценена съвременната тенденция в развитието на потенциално токсичните фитопланктонни видове в българската акватория. Установени са 28 потенциално токсични фитопланктонни вида, принадлежащи към 5 класа: Dinophyceae (19 вида), Bacillariophyceae (4), Cyanophyceae (3) и Prymnesiophyceae и Raphidophyceae (по 1 вид).

2. Концентрациите на определени потенциално токсични видове фитопланктон в българската акватория надхвърлят десетократно стойностите, регистрирани в други черноморски райони с установена токсичност (*Alexandrium tamarense* - 6.5 пъти по-високи; *Dinophysis caudata* - 23 пъти по-високи; *Gonyaulax spinifera* - 30 пъти по-високи; *Lingulodinium polyedrum* - 28 пъти по-високи; *Phalacroma rotundatum* - 29 пъти по-високи).

3. Широкият температурно-солеви диапазон на развитие на *Pseudo-nitzschia* в българската акватория (7.3 – 27.2°C и 6.7 - 20.1 ‰), изведените дългогодишни тенденции за проявление на цъфтежни явления (1959-2014) и липсата на статистически значима корелативна зависимост с физико-химичните фактори на средата са индикация за високия потенциал на адаптиране на локалните естествените популации, което възпрепятства ранното прогнозиране на цъфтежните явления.

4. На базата на приложен иновативен метагенетичен подход са идентифицирани 143 оперативни таксономични единици на микроводораслови таксони, от които 55 фитопланктонни вида не са съобщавани за Черно море. Три от установените 12 потенциално токсични вида (*Karenia bidigitata, Karlodinium veneficum, Pfiesteria piscicida*) са регистрирани за първи път в Черно море.

5. Молекулярният подход с използване на родово специфични праймери, позволява по-висока резолюция за видова идентификация на *Pseudo-nitzschia*. На тази база в българската акватория на Черно море са установени три нови вида: *P. calliantha* не е регистриран пред

нашия бряг, но е съобщаван за други черноморски райони, *P. linea* не е идентифициран в черноморски проби и вариететната форма *P. pungens* var. *aveirensis* - докладвана само за турския бряг.

6. Използването на молекулярни методи за прецизиране на таксономичната идентификация, осигурява висока степен на надеждност при разработване на програми за мониторинг и планове за превенция на цъфтежни и токсични явления.

7. Получените резултати в допълнение с литературните данни за наличие на фикотоксини в миди от българския бряг, обуславят необходимостта от регулярен мониторинг и контрол на крайбрежните води, чрез интегриране на морфологични, генетични и токсикологични анализи.

VII. ПРИНОСИ

Оригинални научни:

1. Настоящата разработка представлява първи опит за изследване на еукариотното фитопланктонно разнообразие и мониторинг на потенциално токсичните видове в българската акватория на Черно море с прилагане на високоефективно секвениране от ново поколение.

2. Настоящото изследване е опит за първи път да се анализира генетичното разнообразие на род *Pseudo-nitzschia* в българската акватория на Черно море (Варненски залив) като са установени нови видове, вариетети и риботипове.

3. Идентифицирането на нови за Черно море фитопланктонни видове, в това число и потенциално токсични, е принос към изследването и прецизирането на биоразнообразието.

4. Получени са оригинални секвенции, депозирани в генетичните бази данни, което обогатява наличната иформация не само за Черно море, но и в глобален мащаб.

Научно-приложни:

1. За първи път е тествана приложимостта на метагенетичния подход за осъществяване на мониторинг на потенциално токсичните видове фитопланктон в българската акватория на Черно море посредством универсални праймери за два различни целеви региона и две платформи за секвениране.

2. Установяването на данни за нови потенциално токсични видове, разпространени в нашата акватория, е сигнал за по-специално внимание и задълбочен анализ на проблема, както и планиране на дейности, целящи минимизиране на възможни негативни ефекти върху околната среда и човека.

3. Потвърдени са предимствата на молекулярната идентификация на род *Pseudo-nitzschia*, като са установени нови видове, които по-рано не са регистрирани в български води.

VIII. ЦИТИРАНА ЛИТЕРАТУРА

Anderson, D.M., 2007. The Ecology and Oceanography of Harmful Algal Blooms: Multidisciplinary Approaches to Research and Management. IOC Technical Series 74, UNESCO 2007.

Anderson, D.M., Cembella, A.D., Hallegraeff, G.M., 2012. Progress in understanding harmful algal blooms: paradigm shifts and new technologies for research, monitoring and management. Annual review of marine science, 4, 143-176.

Bazinet, A., Cummings, M., 2012. A comparative evaluation of sequence classification programs. BMC Bioinformatics, 13(1), 92.

Besiktepe, S., Ryabushko, L., Ediger, D., et al. 2008. Domoic acid production by Pseudo-nitzschia calliantha Lundholm, Moestrup et Hasle (Bacillariophyta) isolated from the Black Sea. Harmful Algae, 7(4), 438-442.

Bourlat, S.J., Borja, A., Gilbert, J., et al., 2013. Genomics in marine monitoring: new opportunities for assessing marine health status. Marine pollution bulletin, 74(1), 19-31.

Cheung M.K., Au, C.H., Chu, K.H., et al., 2010. Composition and genetic diversity of picoeukaryotes in subtropical coastal waters as revealed by 454 pyrosequencing. ISME Journal, 4(8), 1053–1059.

Choi, J.J., Reich, C.F., Pisetsky, D.S., 2004. Release of DNA from dead and dying lymphocyte and monocyte cell lines in vitro. Scandinavian journal of immunology, 60(1-2), 159-166.

Collins, R.A. and Cruickshank, R.H., 2013. The seven deadly sins of DNA barcoding. Molecular ecology resources, 13(6), 969-975.

Danovaro, R., Carugati, L., Berzano, M., et al., 2016. Implementing and Innovating Marine Monitoring Approaches for Assessing Marine Environmental Status. Frontiers in Marine Science, 3, 213.

de Cárcer, D.A., Pedrós-Alió, C., Pearce, D.A., Alcami, A., 2016. Composition and interactions among bacterial, microeukaryotic, and T4-like viral assemblages in lakes from both polar zones. Frontiers in microbiology, 7.

Janson, S. and Hayes, P.K., 2006. Molecular taxonomy of harmful algae. Ecology of Harmful Algae, 9-21.

Kloos, D.U., Strätz, M., Güttler, A., et al., 1994. Inducible cell lysis system for the study of natural transformation and environmental fate of DNA released by cell death. Journal of bacteriology, 176(23), 7352-7361.

Kumar S., Stecher G., and Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets.Molecular Biology and Evolution, 33, 1870-1874.

Librado, P. and Rozas, J., 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics, 25, 1451-1452.

Massana, R., Gobet, A., Audic, S.,et al., 2015. Marine protist diversity in European coastal waters and sediments, as revealed by highthroughput sequencing. Environmental microbiology, 17(10), 1035–4049.

McDonald, S.M., Sarno, D., Zingone, A., 2007. Identifying *Pseudo-nitzschia* species in natural samples using genus-specific PCR primers and clone libraries. Harmful Algae, 6(6), 849–860.

Moestrup, Ø., Akselmann, R., Fraga, S., et al. (Eds), 2009 onwards. IOC-UNESCO Taxonomic Reference List of Harmful Micro Algae.

Moncheva, S. and Parr, B., 2015. Manual for phytoplankton sampling and analysis in the black sea, Phytoplankton Manual, UP-GRADE Black Sea Scene Project, FP7 No: 226592 Black sea Commission, 2010.

Morton, S.L., Vershinin, A., Leighfield, T. A., et al, 2007. Identification of yessotoxin in mussels from the Caucasian Black Sea Coast of the Russian Federation. Toxicon, 50, 581-584.

Morton, S.L., Vershinin, A., Smith, L.L., et al., 2009. Seasonality of *Dinophysis* spp. and *Prorocentrum lima* in Black Sea phytoplankton and associated shellfish toxicity. Harmful Algae, 8(5), 629-636.

Moschandreou, K.K., Baxevanis, A.D., Katikou, P., et al., 2012. Inter- and intra-specific diversity of *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) in the northeastern Mediterranean. European journal of phycology, 47(3), 321-339.

Nagai, S., Hida, K., Urushizaki, S., et al. 2016a. Influences of diurnal sampling bias on fixed-point monitoring of plankton biodiversity determined using a massively parallel sequencing-based technique. Gene, 576, 667–675.

Nagai, S., Hida, K., Urushizaki, S., et al., 2016b. Massively parallel sequencing-based survey of eukaryotic community structures in Hiroshima Bay and Ishigaki Island. Gene, 576, 681–689.Nesterova et al., 2008

Nishitani, G., Nagai, S., Hayakawa, S., et al., 2012. Multiple plastids collected by the dinoflagellate Dinophysis mitra through kleptoplastidy. Applied and environmental microbiology, 78(3), 813-821.

Piredda, R., Sarno, D., Lange, C.B., et al., 2017. Diatom resting stages in surface sediments: A pilot study comparing Next Generation Sequencing and Serial Dilution Cultures. Cryptogamie, Algologie, 38(1), 31-46.Quast et al., 2013

Quijano-Scheggia, S., Garcés, E., Andree, K.B., et al., 2010. *Pseudo-nitzschia* species on the Catalan coast: characterization and contribution to the current knowledge of the distribution of this genus in the Mediterranean Sea. Scientia Marina, 74, 395-410.

Romari, K. and Vaulot, D., 2004. Composition and temporal variability of picoeukaryote communities at a coastal site of the English Channel from 18S rDNA sequences. Limnology and Oceanography, 49(3), 784-798.

Ruggiero, M.V., Sarno, D., Barra, L., et al., 2015. Diversity and temporal pattern of *Pseudo-nitzschia* species (Bacillariophyceae) through the molecular lens. Harmful Algae, 42, 15-24.

Soyer, J., 1970. Bionomie benthique du plateau continental de la cote catalana Française, III. Les Peuplements de Copepodes Harpacticoides (Crustacea). Vie Milieu. 21, 377-511.

Stoeck, T., Bass, D., Nebel, M., et al., 2010. Multiple marker parallel tag environmental DNA sequencing reveals a highly complex eukaryotic community in marine anoxic water. Molecular ecology, 19(s1), 21-31.

Tanabe, A.S., Nagai, S., Hida, H., et al., 2015. Comparative study of the validity of three regions of 18S-rRNA gene for massively parallel sequencing-based monitoring of the planktonic eukaryote community. Molecular ecology resources, 16(2), 402-414.

Tanabe, A.S., 2012a. Claident v0.1.2013.07.23. software distributed by the author at. http://www.claident.org.

Tanabe, A.S., 2012b. Assams v0.1.2013.07.19. software distributed by the author at. http://www.fifthdimension.jp.Terenko and Terenko, 2012

Tragin, M., Zingone, A. and Vaulot, D., 2018. Comparison of coastal phytoplankton composition estimated from the V4 and V9 regions of the 18S rRNA gene with a focus on photosynthetic groups and especially Chlorophyta. Environmental Microbiology, 20(2), 506-520.

Vershinin, A. and Kamnev, A. 2001. Harmful algae in Russian European coastal waters. In: Hallegraeff, G.M., Blackburn, S.I., Bolch, C.J. Lewis, R.J. [Eds.] Harmful Algal Blooms 2000: 112-114.

Vershinin, A., Morton, Sl.L., Pankov, S., et al., 2006. *Alexandrium* in the Black Sea-Identity, ecology and PSP toxicity African Journal of Marine Science, 28, pp. 209–214.

IX. БЛАГОДАРНОСТИ

Изказвам своята най-искрена благодарност на научните си ръководители – проф. д-р Снежана Мончева и доц. д-р Петя Иванова за оказаното доверие и подкрепа, за напътствията и насоките при разработването на дисертационния труд.

Специална благодарност на д-р Satoshi Nagai за това, че прие предизвикателството да обучава напълно непознат човек, за съветите и вдъхновението, и за незаменимата помощ при практическата реализация на тази дисертация.

Благодаря на Наталия Слабакова за експертната помощ, която ми оказа при морфологичното таксономично определяне на фитопланктонните видове и за цялостното съдействие.

Благодаря на колегите от секция „Биология и екология на морето“ за тяхната отзивчивост и добронамереност.

Благодаря на колегите от секция „Химия на морето“ за предоставените физико-химични данни.

Благодаря на проф. дбн Иван Атанасов за предоставената възможност да анализирам част от пробите в лабораторията по Молекулярна генетика в АБИ, както и за помощта и насоките.

Благодаря на проф. дбн Марияна Филипова за цялостната подкрепа.

Благодаря на моето семейство за търпението и подкрепата.

Разработването на дисертационния труд беше подпомогнато от Международен стипендиантски фонд за 2015 година на Японската асоциация на жените в университетите (FY2015 International Fellowship fund from the Japanese Association of University Women) и проект DEVOTES, 7FP, GA 308392.

Списък на публикациите по темата на дисертацията

Dzhembekova, N., Urusizaki, S., Moncheva, S., Ivanova, P. and Nagai, S., 2017. Applicability of massively parallel sequencing on monitoring harmful algae at Varna Bay in the Black Sea. Harmful Algae, 68, 40-51.

Nagai, S., Urusizaki, S., Hongo, Y., Chen, H. and **Dzhembekova, N.**, 2017. An attempt to semi-quantify potentially toxic diatoms of the genus *Pseudo-nitzschia* in Tokyo Bay, Japan by using massively parallel sequencing technology. Plankton and Benthos Research, 12(4), 248-258.

Dzhembekova N., Moncheva S. 2015. Relationship between some environmental factors and the abundance and distribution of potentially toxic *Pseudo-nitzschia* species along the Bulgarian Black sea coast. Proceedings of the third student scientific conference "Ecology and Environment", Shumen Volume 2: 153-163, ISSN 2367-5209.

Dzhembekova, N., Moncheva, S. 2014. Recent trends of potentially toxic phytoplankton species along the Bulgarian Black Sea area, Twelfth International Conference On Marine Sciences and Technologies – Proceedings, 321-329, ISSN 1314-0957.

MOLECULAR TAXONOMY AND ECOLOGY OF POTENTIALLY TOXIC PHYTOPLANKTON SPECIES IN THE BLACK SEA

NINA DZHEMBEKOVA

Supervisors: Prof. Snejana Moncheva and Assoc. Prof. Petya Ivanova

Abstract:

The aim of the thesis was to clarify the taxonomic affiliation of potentially toxic phytoplankton species in the Bulgarian Black Sea waters using molecular approaches and to specify *Pseudo-nitzschia* species composition and to study the autecology of the genus at a local scale.

Long-term morphology based dataset (1999-2014) was analyzed to determine the presence of potentially toxic species, their spatial and temporal distribution. The relationship between the presence of *Pseudo-nitzschia* spp. and some environmental factors was investigated. A metagenetics approach was applied for identification of potentially toxic phytoplankton species in Varna Bay and its potential for integration in the monitoring programs was tested. Molecular identification of *Pseudo-nitzschia* species in natural samples from Varna Bay using genus specific LSU rDNA primers was performed.

The analyses of the long-term data revealed the presence of 28 potentially toxic species, 9 of them constantly present and common for the Bulgarian Black Sea. Some species reached much higher cell abundance in Bulgarian waters than that related to proven toxic event in other Black Sea regions (*Alexandrium tamarense* - 6.5 times higher; *Dinophysis caudata* - 23 times higher; *Gonyaulax spinifera* - 30 times higher; *Lingulodinium polyedrum* - 28 times higher; *Phalacroma rotundatum* - 29 times higher).

The wide temperature-salinity tolerance of *Pseudo-nitzshia* in the Bulgarian part of the Black Sea (7.3 – 27.2°C and 6.7 - 20.1 ‰), the long-term trend of blooming events (1959 - 2014), and the lack of statistically significant correlation with the environmental factors indicate the high potential of adaptation of the local natural populations, which impedes the early prediction of blooms.

Using metabarcoding, 143 operational taxonomic units affiliated to microalgae were identified. 55 phytoplankton species haven't been described in the Black Sea earlier. Among the 12 potentially toxic species, 3 were reported for the first time in the Black Sea in the present study (*Karenia bidigitata*, *Karlodinium veneficum*, *Pfiesteria piscicida*).

The molecular approach based on the sequencing of cloned LSU rRNA genes in 20 genetic libraries constructed from environmental samples allowed higher resolutuion of *Pseudo-nitzscha* species identification. Three species were determined: *P. calliantha* – new for the Bulgarian part but reported in other Black Sea regions, *P. linea* – new for the Black Sea, and *P. pungens* var. *aveirensis* – found earlier only in Turkish waters.

Molecular methods for taxonomic identification of phytoplankton are promising tools for the development of monitoring programs. The results obtained, in addition to the literature records of phycotoxins in mussels from the Bulgarian Black Sea, stress the need of regular monitoring and control of the coastal waters, integrating morphological, molecular and toxicity analyses.