

## Рецензия

От: Проф. Искра Витанова Иванова, дбн,

Относно: оценка на дисертационен труд за придобиване на образователна и научна степен “доктор” в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление, 4.3 Биологически науки, докторска програма Микробиология

Автор на дисертационния труд: **Николега Иванова Ботева**

Заглавие на дисертационния труд: **Разнообразие и биотехнологичен потенциал на термофилни микроорганизми от български горещи извори**

Научен ръководител: проф. дбн Маргарита Камбурова

### 1. АКТУАЛНОСТ И ЗНАЧИМОСТ НА РАЗРАБОТВАНИЯ ПРОБЛЕМ

По-малко от 5% от представените в природата микробни видове са „култивируеми”, като в екстремните ниши този дял е още по-малък. Понятието „култивируеми микроорганизми“ е относително и касае способността да се възпроизведат в лабораторията специфичните условия, които дадена ниша предоставя за развитието им. Откриването на термофилната бактерия *Thermus aquaticus* през 1965 г. от Томас Брок поставя началото на ново направление в микробиологията - термофилията, с която са свързани редица фундаментални и приложни въпроси. Термофилните бактерии по-скоро се отнасят към групата на екстремните (растат оптимално при 70°C, с максимум 80°C) или умерени термофили, (50-60°C, максимум до 70°C). Археите доминират в геотермални извори с температура над 90°C и се отнасят към хипертермофилните микроорганизми. Термофилните микроорганизми са обект на специално внимание заради важното им място както във фундаменталната, така и в приложната наука. С тях е свързан въпросът за произхода на живота, за молекулната основа на термофилността и термостабилността, за адаптивните механизми за живот. За биотехнологичната промишленост от особено значение са термофилните ензими (термозими), характеризиращи се с висок температурен оптимум и стабилност към температура, органични разтворители, детергенти.

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

## **2. ОБЕМ И СТРУКТУРА НА ДИСЕРТАЦИЯТА**

Дисертацията е изложена на 171 стандартни страници текст. Спазена е общоприетата схема и препоръчителните съотношения между отделните части на труда, както следва: *Въведение* – 1стр., *Литературен обзор* – 28 стр., *Цел и задачи* – 1стр., *Материали и методи* – 13стр., *Резултати и обсъждане* – 103 стр. и *Заключение и Изводи и Приноси*– 4стр., *Литература* – 21 стр. Получените резултати са илюстрирани с 58 фигури и 19 таблици. .

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

Настоящата дисертация е комплексна и предполага добро познаване на литературните източници и методите за решаването ѝ. Докторантката е направила обстоен преглед на постиженията на други изследователи, които е успяла да предаде и анализира върху 29 страници в литературния обзор. Обзорът представя детайлно състоянието на проблема и доказва необходимостта от разработването на дисертационната теза. Разгледани са редица въпроси, свързани с термофилни микроорганизми и с биоразнообразието и метаболитните стратегии при термофилни микроорганизми. Представени са данни за молекулни основи на термофилността и термостабилността, като и метагеномния подход за таксономично и функционално профилиране на микробни съобщества. Интерес представляват и представените метагеномни подходи за откриване на нови биокатализатори с приложен потенциал от термофилни микроорганизми. Понастоящем броят на секвенираните геноми от термофилни микроорганизми наброява 1003 и е пряко обвързан със степента на аотираност на метагеномни секвенции от термални биотопи. В обзора е представена е информация за термостабилни ксиланази, липолитични ензими, термофилни липази, пектин и пектинолитични ензими. Разгледан е и род *Caldicellulosiruptor* и неговия биотехнологичен потенциал. На вниманието на читателя се предлагат и някои нерешени проблеми. Литературният обзор е конкретен, структуриран е правилно, следвайки логическата обвързаност на информацията. Данните от справката са послужили за ясното и правилно определяне не само на целта, но и за формулировката на задачите. Поставени са за решаване добре обосновани 14 експериментални задачи.

Литературата (както в обзора, така и в целия труд) е тясно свързана с темата на дисертационния труд. Литературният списък включва внушителния, дори за голяма докторска дисертация брой от 404 заглавия на латиница. Те са основно от последните години. Това говори за отлична теоретична осведоменост на докторантката и с цел намиране на ново научно предизвикателство.

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

Разделът "Материали и методи" демонстрира внушителен набор от методи, съобразени с конкретните изисквания на експериментите. Те са съвременни и адекватни за реализацията на дисертационния труд. Описани са точно и подробно, като изцяло покриват многостранните области на работата: от класическите до модерните микробиологични изследвания, включващи изолиране и начално охарактеризиране на чисти микробни култури, изолиране на тотална ДНК щамове, метагеномен анализ включващ: изолиране на метагеномна ДНК от седиментни проби и анаеробни култури. В отделните етапи на работата докторантката съчетава умело основните микробиологични подходи, със съвременни молекулярно-генетични методи и биохимични методи. Всички това ми позволява да дам висока оценка на научното ниво и на отличната подготовка на докторантката, която успява правилно да съчетае многообразие от класически със съвременни методи за целите на дисертацията, успешно решавайки поставените експериментални задачи.

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

Целта на настоящото е изследване на филогенетичното разнообразие и биотехнологичния потенциал на термофилни микроорганизми в български горещи извори. За целта на настоящата работа са изследвани седиментни и водни проби от басейна на Рупи, извори Левуново, Власа и Мизинка.

Раздел „*Резултати и обсъждане*“ е добре структуриран, подкрепен с табличен и графичен материал, с подходяща интерпретация на получени резултати от чужди научни колективи. Авторката последователно представя доказателствен материал по своята научна теза, като по този начин логически финализира експериментална работа. Извършена е голяма по обем и разнообразна експериментална работа в рамките на комплексно микробиологично и молекулярно-генетично изследване. Трудността за създаване на условия за култивиране, покриващи разнообразните енергийни стратегии на термофилите, определя метагеномния анализ като изключително ценен способ за изучаване на метаболизма в термофилни микробни съобщества. Генетичната информация, получена от секвенции или частично реконструирани геноми от различни биотопи, не само определя таксономичната структура и функциониране на термофилното съобщество, но и предоставя огромно количество кодиращи секвенции, които могат да бъдат клонирани и функционално анализирани.

Много често при търсене на определени ензими се използват култивационни техники и условия, благоприятстващи развитието на съответни микробни продуценти, комбинирано със секвениране на метагеномната ДНК на културата или изграждане на експресионни библиотеки и функционален скрининг. Техниките за обогатяване на микробен консорциум, характеризиращ се с по-ниско биоразнообразие и целенасочено разграждащ определен

субстрат е възможност за концентриране и възстановяване на гени, кодиращи търсени функции. Получените резултати показват, че умерено термофилни, термофилни и хипертермофилни бактерии доминират в изследваните микробни съобщества. Установено е присъствие на термофилни археи, като техният дял варира в различните термални извори. Значителна част от контигите с дължина над 1 kb, представени в метагеномите на изворите се отнеса към некултивируеми клонове, свидетелстващо за степента на съществуването на нови таксони в българските извори. Метаболитната реконструкция на метагеномите от изследваните извори разкрива присъствието на гени за ензими от основните метаболитни пътища, така и специфични за тези екстремни ниши като свързаните с метаногенезата, ацетогенезата, водородогенезата, сулфат редуцията, редуция на сяра или желязо. Метагеномният анализ на обогатения на ксилан термофилен консорциум в две изследвани култури показва силно доминиране на екстремно термофилните анаероби. От всеки извор са реконструирани по няколко драфт генома, отнасящи се предимно до екстремни и хипертермофилни микроорганизми или непознати такива. От реконструирания драфт геном на *Ca. Calescibacterium sp.* е успешно експресиран ген за термостабилна липаза, характеризираща се с висок температурен оптимум от 80°C и термостабилност до 30 мин. при 99°C и 3 дни при 70°C, както и устойчивост на органични разтворители. Изолиран е екстремно термофилен облигатно анаеробен щам, описан като *Caldicellulosiruptor sp.* 11.4 с 96% идентичност на 16S рРНК ген с най-близкия филогенетичен съсед *C. acetigenus* и разлика в редица фенотипни свойства.

Авторката установява, че култивируемите изолати на термофилните анаероби показат по-разнообразен синтетичен потенциал от аеробите. Частично пречистената полигалактуроназа от култивируемия анаеробен термофил *Caldicellulosiruptor sp.* 11.4 има необичайно висока термостабилност (80°C оптимална температура, запазваща 50% активност в дапазона 70° - 88°C). Всички резултати са представени и анализирани в отделните глави от раздела „Резултати и обсъждане“, които логично следват хода на решаването на поставените задачи. Те са обобщени и дискутирани в светлината на публикуваните данни от последните години, Висока оценка заслужават както идеята, така и обемът от изследвания проведен по изпълнението на тази задача и в целия труд. Направената дискусия по всеки експеримент, съпоставката на резултатите за отделните щамове и експерименти, и съпоставката с литературните данни, още веднъж подчертава качествата на докторантката и владенето на експерименталната теория. С това тя доказва, че е овладяла напълно третата степен на обучението си и е завършен експериментатор. Приемам направените приноси.

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

Николета Ботева е водещ автор във всичките научни публикации, като водещ изследовател, което показва творческата и изследователската ѝ активност при изработването и оформянето им. Резултатите от дисертацията са публикувани в списанието CR ACAD BULG SCI. и в глава от книга. Също така е представила– 2 бр. участия с доклади в национални научни форуми и 3 бр. постера в национални и международни форуми.

### Статии:

- ✓ Boteva, N., Kambourova M. (2018) Thermophiles and their exploration for thermostable enzyme production. In: Extremophiles in Eurasian Ecosystems: Ecology, Diversity, and Applications (Egamberdieva, D., Birkeland, N.-K., Panosyan H., Li W.-J., eds). Springer Ltd. Pp. 167-186.
- ✓ Boteva, N., Birkeland, N.-K., Kambourova M. Complete nitrogen cycle driven by the thermophilic microbial community of Rupii II hot spring. **CR ACAD BULG SCI**, V.74 No1 pp.59-69.
- ✓ Boteva, N., Birkeland, N.-K., Kambourova M. Metagenome-assembled Genomes Related to Ammoniaoxidizing Thaumarchaeota Recovered from Near-anoxic Environment. **CR ACAD BULG SCI**, V.74 No3 pp.363-372.

### Доклади:

- ✓ Boteva, N. Diversity and Biotechnology of Extremophiles. International Conference 26-28 September, 2016, Sofia: METAGENOMIC ANALYSIS OF THERMOPHILIC DNAs ISOLATED FROM BULGARIAN HOT SPRINGS
- ✓ Boteva N., Kambourova M., Birkeland N-K. Diversity and biotechnological Potential of microbial communities in Bulgarian hot springs assessed by metagenomic analysis. Първа Национална конференция за докторанти 2016, проведена на 01.11.2016 г. в гр, Пловдив.

### Постери:

- ✓ Boteva N., Kambourova M., Birkeland N-K. Biodiversity of extreme and hyperthermophilic microorganisms from Bulgarian hot springs. 10ти Балкански Конгрес по Микробиология МИКРОБИОЛОГИЯ БАЛКАНИКА 2017;
- ✓ Stoilova-Disheva M., Lyutskanova D., Boyadzhieva I., Radchenkova N., Boteva N., Birkeland N.-K., Kambourova M. "The archaeal community in the Vlasa hot spring, in Velingrad, Bulgaria is extremely diverse and novel". 11th International Congress of extremophiles, 12-16.09.2016, Kyoto, Japan;

- ✓ Stoilova-Disheva M., Lyutskanova D., Boyadzhieva I., Radchenkova N., Boteva N., Birkeland N.-K., Kambourova M. Phylogenetic analysis revealed novel and unexpected structure of archaeal community in Vlasa hot spring, Velingrad, Bulgaria. *Molecular Biology of Archaea* 5. Focused Meeting of Microbiology Society, 1-3 August 2016, London, UK.

Не познавам докторантката и направените от мен забележки и предложения в предварителната рецензия са корегирани коректно.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

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

Въз основа на приведените аргументи за актуалност на проблематиката и оригиналните приноси, отразени в дисертационния труд давам своята висока оценка за неговата защита и препоръчвам на членовете на научното жури да присъдят на дисертантката Ботева образователната и научна степен „Доктор” по професионално направление 4.3. Биологически науки, специалност Микробиология.

14.06.2021 г.

Подпис: