

## РЕЦЕНЗИЯ

На дисертационния труд на тема:  
**„Разнообразие и биотехнологичен потенциал на термофилни микроорганизми от български горещи извори“**  
**по конкурс:** за присъждане на ОНС „Доктор“  
на редовен докторант **Николета БОТЕВА**,  
с научен ръководител: **проф. Д-р Маргарита Камбурова, дбн**  
по научно направление **4.3. Биологични науки (специалност Микробиология)**

**РЕЦЕНЗЕНТ:** доц. д-р Светла Трифонова Данова, дбн  
Департамент по Обща микробиология,  
Институт по микробиология „*Стефан Ангелов*“ - БАН

### ОТНОСНО ПРОЦЕДУРАТА:

На основание Решение на Научния съвет на Институт по микробиология – БАН (*Протокол № 17 /22.04.2021 г.*) и Заповед № I-41/23.04.2021 на Директора съм избран за член на Научно жури по горепосочения конкурс. Той се провежда съгласно процедурата по действащия през 2016 г. ЗРАСРБ. На първото заседание на Научното жури от 11.05.2021 г. съм определена за рецензент.

Декларирам, че не съществува конфликт на интереси по смисъла на ал. 1 т. 3 и 5 от ЗРАСРБ с оценявания кандидат в конкурса за ОНС „Доктор“.

### ДАНИ ЗА КАНДИДАТА:

Познавам лично докторант Николета Ботева, като студент от ХТМУ – Магистърска програма „Биотехнологии“, в курса по Пробиотици. Тя е дипломиран инж. Биотехнолог с подчертан интерес към молекулярно-биологичните изследвания на микроорганизми от различни хабитати. Владее отлично - писмено и говоримо английски език. Специализирала е в Бергенски Университет, Департамент Биология, Норвегия по тема „*Анаеробно култивиране на термофилни микроорганизми и метагеномни анализи*“ под ръководството на проф. Нилс Каре Биркеланд и „Хроматографски методи за изследване на липиди и мастни киселини“ под ръководството на д-р Анарита Поли и Едуардо Пагнота в Институт по биомолекулярна химия (ICB) (C.N.R.) Италия. Отличава се с любознателност и стремеж да работи по най-нови научни проблеми и винаги търси научното предизвикателство.

### ОЦЕНКА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД:

## 1. Актуалност и значимост на разработвания проблем

Представеният ми за рецензия диертационен труд търси отговори на важни и актуални научни проблеми свързани със слабо проучените термални екологични ниши и тяхната микробиота. България е сред изключително богатите на топли извори страни, чието биоразнообразие е слабо проучено. Тяхното изучаване е в унисон със засиления екологичен и биотехнологичен интерес към термофилните микроорганизми и е важно не само на национално но и на международно ниво в търсене на нови биокатализатори и микробиални ензими. Подобни изследвания, осветляват въпроси от фундаментална значимост, свързани с активността на биологичните молекули и биоценози в екстремални хабитати. Отчитайки доказаните ограничения на културелно-зависимите методи за охарактеризиране биоразнообразието, докторантката е избрала модерните метагеномни и молекулярно-генетични анализи. Всичко това ми дава основание да оценя дисертацията като актуална и значима, разработена в една от водещите в Европа лаборатории по Екстремофилни микроорганизми, към ИмикБ-БАН, под ръководството на проф. М. Камбурова.

## 2. Обем и структура на дисертацията:

Дисертацията е изложена на 171 стандартни страници двустранен текст, което включва и списъците на публикациите по дисертацията с участията в научни форуми. Спазена е общоприетата схема и препоръчителни съотношения между отделните части на труда, както следва: *Увод* – 1 стр., *Литературен обзор* - 27 стр., *Цел и задачи* – 1 стр., *Материали и методи* – 14 стр., *Резултати и обсъждане* – 95 стр., *Заключение* -1 стр., *Изводи* – 2 стр., *Приноси* - 2 стр.; *Използвана литература* – 20 стр.

Отлично впечатление прави стегнатият научен стил, използван при написването на дисертационния труд и илюстративния материал - 58 цветни фигури и 19 таблици, почти всичките онагледяващи получените резултати по характеризирани филогенетичното разнообразие и биотехнологична значимост на екстремофилната микробиота на български термални извори.

В съгласие с поставените задачи раздел Резултати и обсъждане се състои от шест основни части: Метагеномен анализ на микроорганизмите, представени в проби от три български хипертермални извора и реконструкция на драфт геноми от тези метагеноми; Идентификация на отворени рамки на четене, значителна част от които на непознати белтъци; Метагеномен анализ на таргетно набогатени анаеробни култури от два извора в присъствие на желани субстрати; Клониране, експресия и характеризирани на термофилен ензим (липаза) от некултивируем микроорганизъм; Изолиране и характеризирани на

екстремно- термофилни анаероби; Синтеза, пречистване и характеристика на термостабилна пектиназа, синтезирана от новоизолиран микроорганизъм. Дискусията на получените резултати е проведена в сравнителен аспект с резултатите на други автори, работещи в същата област с умело открояване на българския принос сред тези изследвания.

### 3. Литературна осведоменост и постановка на целта и задачите

Литературният обзор е конкретен и целево написан, като показва наличната информация от последните години. Последователно са разгледани екстремофили и термофилни микроорганизми, публикуваните данни тяхното биоразнообразие и метаболитни стратегии и молекулни основи на термофилността и термостабилността. Прави отлично впечатление критичният анализ и начина на представяне на новите методични подходи. Николета Ботева е подбрала и включила най-важните елементи от информацията за метагеномните анализи за таксономично и функционално профилиране на микробни съобщества и метагеномни подходи за откриване на нови термофилни биокатализатори, обобщавайки биотехнологично значение на термофилните микроорганизми. Добре би било в тази част да се представят и постиженията на български колектив(и) по изследване на екстремофилни местообитания за да се очертае необходимостта от изследване на непроучени български термални извори. Независимо от тази забележка, от обзора личи отлична литературна осведоменост на докторантката и познаване на научните проблеми които разработва. В обзора е направен и кратък анализ за филогенезата на мезофили и термофили, в светлината на най-новите теории за произхода и еволюцията на живота на нашата планета. Така закономерно е очертана необходимостта от проучване на биоразнообразието посредством посредством метагеномни изследвания. Това е само част от много амбициозната цел: да се *определи филогенетичното разнообразие и биотехнологичния потенциал на термофилни микроорганизми в български горещи извори*“. Целта и 8те задачи са много ясно формулирани и онагледени с оригинална схема показваща подходите за постигането. За постигането и са поставени следните 8 задачи:

1. Таксономичен и функционален метагеномен анализ на ДНК изолирана от седименти и вода за охарактеризиране съобществата в български горещи извори.
2. Реконструкция на MAGs и определяне на термофилните участници в азотния цикъл.
3. Метагеномен анализ на анаеробни набогатени култури от екстремни термофили.

4. Клонирание, експресия, пречистване и характеризирание на термофилна липаза от реконструиран геном на некултивируем термофил.
5. Изолиране на екстремно термофилни аероби.
6. Изолиране на екстремно- и/или хипертермофилни анаероби.
7. Скрининг за продуценти на въглехидрат-разграждащи ензими.
8. Пречистване и характеризирание на термофилен ензим с приложен потенциал от култивируем термофил.

Не мога да не отбележа, че много от задачите са толкова обемни и комплексни, че могат да са обект на самостоятелна разработка за ОНС „Доктор“. Те са научно предизвикателство дори за голяма изследователска група, с оглед времевата рамка от 3 години на докторантурата и финансирането. При това изследването не е върху един обект. Събрани и сравнени са термални седиментни и водни проби от басейна на Рупи (който формира три пространствено раздалечени извора) и още извора край Власа (86°C), централна България, Мизинка във Велинград (88°C), централна България, този край село Левуново (83°C), югозападна България.

Докторантката не ограничава изследването до охарактеризиране на представителите на геотермални извори, а продължава с изпълнението на задача по култивиране и идентифициране на аеробни и анаеробни термофили и с клонирание и експресия на термофилна липаза от реконструиран геном на некултивируем термофил и да го сравни с ензими от изолиран култивируем представител на същата група бактерии.

#### **4. Оценка на използваните материали и методи:**

Изпълнението на тази амбициозна изследователска програма е осъществено с богат набор от култивационни микробиологични, молекулярно-генетични и модерни биоинформатични методи. Те са системно представени в раздела *Материали и методи* като изцяло покриват етапите на работата. Бих препоръчала при следващи разработки методите да бъдат тематично групирани, микробиологични, генетични биоинформатични. Това категорично не омаловажава, сложността и комплексността на работата.

Прави много добро впечатление включването на метагеномни анализи, Shotgun секвениране с платформа за секвениране MiSeq Illumina paired ends; проверка на качеството на секвенциите, триминг, отстраняване на адапторите от секвенирането и използвани нови биоинформатични програми FastQC и Trimmomatic. Успешно са асамблирани получените контиги с програма CLC Genomics Workbench на QIAGEN при

метагеномен режим за *de novo* асемблиране. Тези анализи са основани на метагеномна ДНК, чието изолиране е нелека задача с оглед ниското микробно число в събраните водни и седиментни проби. Това доказва отлична теоретична и експериментална подготовка и умение за работа с комбинация от микробиологични и генетични методи и бionформатични програми, без които модерната полифазна таксономия на микроорганизмите би била невъзможна. Подборът и прилагането на такъв разнообразен панел от методични подходи доказва, че докторантката е изграден молекулярен биолог и микробиолог.

Николета Ботева е усвоила и приложила Hungate техника за набогатени анаеробни култури, което е нов подход в звеното, за работа с анаеробна микробиота от подобни хабитати. Следователно тя умее да преодолява трудности и да адаптира протоколите за изпълнение на конкретни експериментални задачи. Това важи и от избраните методични подходи за доказване на важни биологично - активни ензими, за тяхното охарактеризиране и експресия и най-вече при клонирането на термофилна липаза, основано на реконструиран геном на некултивируем термофил. Оценявам високо факта, че наученото по време на специализациите в чужбина – в Норвегия и Италия тя е приложила, в условията които предоставя ИмикБ-БАН и намира място в разработената дисертация.

## 5. **Оценка на получените резултати:**

Разделът „*Резултати и обсъждане*“ е най-голям и в съответствие със експерименталните задачи обобщава получените резултати от: (1) Метагеномен анализ на микробиотата при три български хипертермални извора - седиментни проби от Рупи II и Власа и водна проба от Рупи I, (2) заедно с реконструкция на драфт геноми от тези метагеноми; (3) Идентификация на отворени рамки на четене, значителна част от които на непознати белтъци; (4) Метагеномен анализ на таргетно набогатени култури от два извора в присъствие на желани субстрати; и (5) подбор на ген за термофилна липаза от реконструиран геном на некултивируем термофил който (6) успешно е клониран, експресия, частично пречистен и характеризирани; (7) Изолиране и характеризирани на екстремно- термофилни анаероби; (8) Синтеза, пречистване и характеристика на термостабилна пектиназа, синтезирана от новоизолиран микроорганизъм от род *Caldicellulosiruptor*.

Цялостното изследване е добре планирано. Още в първия етап на работа, анализирайки различките в химическия състав на геотермалните извори обект на разработка докторантката избира седиментни проби от Рупи II и Власа и водна проба от

Рупи I, и прилага метагеномно шот гън секвениране, а не метагеномен 16S рНК ампликон, с цел да се получи информация както за таксономичната структура, така и за функционирането на термофилните съобщества и техния биотехнологичния потенциал. Много добри впечатления прави охарактеризирането на таксономична структура на микробните съобщества в Рупи I, Рупи II и Власа, базирано първо на неасамблирани метагеноми, умело използвайки MG Rast и RefSeq базата данни. Успешно са аотирани микробиомното разнообразие първо до ниво царство, последвано от бактериално разнообразие на ниво род с доказани общи и уникални бактериални родове идентифицирани над 1% в тези 3 различни геотермални басейна. Много успешно Николета Ботева анализира биоразнообразието и заключава, че въпреки ниското съдържание на органични вещества в горещите води, идентифицирането на два различни метаболитни типа в термофилното съобщество като доминиращи (литотрофните *Aquifex*, *Hydrogenobacter* и хетеротрофните *Thermus*) свидетелства за метаболитния кръг на органотрофна синтеза от литоавтотрофите, което позволява растежа на хетеротрофите. Получени са за първи път уникални данни за доминиращите родове в основни микробиални типове ( phylum) и е доказано ниско представителство на археи, подобни на термални хабитати в Индия. Успешният анализ на получените секвенции и боравенето с базите данни за метагеноми е основа за идентифициране на различни видове от доминантните родове. За първи път се докладват (макар и минорно представени), присъствието на фотосинтетични бактерии, в литературата няма данни засега за фотосинтетични процеси при температури по-високи от 75°C. Нови и ценни са данните и от таксономични профили на археите и термофилните вируси в трите български извора, което е предпоставка за по-нататъшни проучвания. С тези и други детайлни анализи докторантката дава богата и научно издържана картина на голямо бактериално разнообразие, висока степен на неизследваност и приложен потенциал, което оценявам много високо. Същото важи за високо научната метаболитна реконструкция с използване на MG Rast и базата данни KEGG на получените данни със стратегия shotgun секвениране. При това функционалният анализ е направен на асемблираните метагеноми с цел докладваните функционални характеристики да се отнасят за пълни ORFs, които биха могли да бъдат клонирани. Това още веднъж доказва, че нито един от тези анализи не е самоцелен, а съществува строга логическа последователност при изпълнение на задачите. Благодарение на уменията за използване на програма програма Anvi'o за human guided binning и реконструкция на драфт геноми, Н. Ботева успешно прави опит за реконструкция на геноми от некултивируеми термофили, изследвайки метагеномите от

Рупи I, Рупи II и Власа. При това са реконструирани най-много драфт геноми – 18, от Рупи II в по-голямата част от некултивируеми бактерии, и 4 драфт генома са отнесени към некултивируеми археи.

Работата на докторантката дават много полезна информация за слабо проучения прокариотен компонент, задвижващ биогеохимичния цикъл на азота, сярата или въглерода в тези екстремални екологични ниши. Това е илюстрирано с оригинални схеми представени като фиг. 34 и 36 ( за кръговрата на азот и въглерод респективно) в раздела. Разкрити са различни метаболитни типове включващи хетеротрофи и хемолитотрофи, включително метаногенни, ацетогенни, хидрогенотрофни, нитрифициращи (включително амоняк-окислителни и нитрит-окислителни), сяра окисляващи и окисляващи ароматни съединения. прокариотния компонент задвижващ биогеохимичния цикъл на азота, сярата или въглерода са все още неизяснени. Представената работа успешно разкрива геномно-базираните характеристики, определящи физиологичните предимства на термофили и археи, позволяващи тяхното разпространение и екологичен успех вкл. в такива екстремни обитания. Сякаш за да провери достоверността на получената информация докторантката допълва работната програма с *Метагеномен анализ на набогатени култури* от Левуново и Мизинка в среда с ксилан. Приложен е оригинален подход на набогатяването на микробни съобщества в среди с предварително избрани субстрати, повлиявайки композицията на микробното съобщество от избраните извори, създавайки селективни култивационни условия за изолиране на перспективен продуцент. Така обратно на досегашните разбирания е доказано по-голямо биоразнообразие в културата от по-горещия извор Мизинка, включващо бактерии и особено археи. Охарактеризирани са генетичните детерминанти на доминиращите семейства на гликозил трансферази от семейства GT4 (37 ORFs от Левуново и 39 ORFs от Мизинка) и GT2 (22 ORFs от Левуново и 24 ORFs от Мизинка), които обединяват разнообразни ензими, участващи в биосинтеза на захароза, дигалактозил диацилглицерол, трехалоза, целулоза, хитин, хиалуронан и др. А от От семействата на гликозил хидролазите са открити представители на GH13, GH4, GH3, GH57, GH3, GH2 семействата и такива с неизвестен произход. Получените резултати определят последващия етап на работа с реконструирания драфт геном на некултивируемия термофил *Candidatus Calescibacterium (R2.1- Calescibacterium)* от метагенома на извор Рупи II. Сред анализираните гени с приложен потенциал докторантката избира и успешно клониране, експресира и характеризирани на термофилна липаза (LipR) от тази некултивируемата бактерия. В този етап тя умело съчетава отличната подготвеност по генетични анализи с умение за прилагане на

биохимични и молекулярни такива. Доказва филогенетичните връзки на този ензим с alpha/beta fold hydrolase от NCBI и освен успешното охарактеризиране на хетероложно експресирания ензим Николета Ботева, прави заключение че екстремофилният начин на живот е насочил еволюцията на протеините към някои общи, структурни адаптивни стратегии, които осигуряват висока устойчивост към денатуриращи агенти.

На много високо научно ниво е и последната част от експерименталната работа по определяне на биотехнологичен потенциал на култивируеми аеробни и анаеробни термофили. При това тя идентифицира по 16S rRNA гени 17 представители на *Geobacillus* sp. и 5 анаеробни, отнесени към *Caldicellulosiruptor*, *Thermotoga*, *Thermovorax*, сред които такива със степен на сродство под определената като граница за един и същи вид. Тук искам да попитам докторантката:

*Счита ли, че в изследваните български термални извори може да имаме нови за науката таксони вкл. сред описаните и идентифицирани от самата нея? И ако е така кога това ще бъде публикувано?*

**б. Оценка на направените изводи, приноси и наукометричните показатели съгласно изискванията на ЗРАСРБ**

Представеният дисертационен труд обобщава огромен по обем и тематично разнообразие изследователски материал с много резултати от различни геномни, биохимични, таксономични и микробиологични изследвания на непроучени в такъв мащаб български термални извори и тяхната микробиота. Независимо от факта, докторантката успешно ги е обобщила в 12 ясно и точно формулирани извода. Те са следствие от получените резултати от изпълнените 8 експериментални задачи. В направеното заключение докторантката успешно обобщава перспективите и възможностите за по-нататъшни проектни и научно –изследователски разработки.

В работата има бесспорно множество оригинални приноси както научни така и с методичен характер. Приносите обективно са разделени на научни и научно-приложни и ясно личи оригиналните сред тях. Част от протоколите на експериментите с успех могат да послужат като нови алгоритмите за охарактеризиране на микробно ббиоразнообразие и биотехнологичен потенциал не само на микробиотата от екстремни хабитати.

Само малка част от тези нови и интересни постижения обаче са намерили място в публикации свързани с дисертацията. Това са две статии в периодични научни списания с Импакт фактор и една глава от книга в международно издание (Springer), с които напълно изпълнява изискванията на ЗРАСРБ и Правилниците за неговото прилагане. Бих искала да препоръчам и останалите резултати да бъдат представени след защитата пред



международната научна общност, защото са изключително интересни и са предпоставка за охарактеризиране на тези хабитати.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

В заключение искам да подчертая, че материалът е дисертабилен. 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.

С риск да се повтора ще подчертая, че работата далеч надхвърля нужното за получаване на ОНС Доктор и еднозначно доказва висока професионална подготвеност и научни знания и умения в областта на модерната микробиология на кандидатката. Натрупаният опит в хода на работа, по отношение на култивирането и изолирането на анаеробни термофили е предпоставка за инициране на проекти за търсене на нови анаеробни продуценти на ензими с практически потенциал. . Както сама е оценила докторантката данните получени от метагеномния анализ могат да послужат като основа за създаване на по-селективни лабораторни условия в търсене на достъп до некултивируемите термофили. Метагеномно секвениране с по-голям мащаб би било успешна основа за реконструиране на повече геноми, с по-високо качество от некултивируеми микроорганизми

Въз основа на гореизложеното уверено мога да заявя, че рецензията дисертационен труд представлява оригинална научна разработка, с теоретично и приложно значение. Той отговаря и надхвърля всички условия на Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилника за неговото приложение и Правилника на ИмикБ-БАН

Всичко това ми дава основание за цялостна отлична оценка на дисертационния труд, въз основа на която предлагам на уважаваното научно жури да присъди **образователната и научна степен „ДОКТОР” на НИКОЛЕТА БОТЕВА**, по Професионално направление 4.3. Биологични науки (специалност Микробиология).

**София, 13.06.2021 г.**

**Рецензент: .....**

**(проф. С. Данова, дбн)**