

РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационен труд, представен пред научно жури, сформирано със заповед № РД 38-82/04.02.2016 на Ректора на Софийски Университет „Св. Климент Охридски“ за получаване на образователната и научна степен “доктор”

Автор на дисертационния труд: Марта Никифорова Енчева- Малинова

Тема на дисертационния труд: „Актиномиценти, продуценти на антибиотици от остров Ливингстън, Антрактика”

Рецензент: проф. д-р Венета Иванова Грудева

1. Актуалност и значимост на дисертационната тема

Актиномицетите са специфична група прокариоти, които са обект на постоянен научен интерес. Този интерес е провокиран от една страна поради активното им участие в биогеохимичните цикли и минерализирането на мъртвата органична материя и от друга - поради специфичните им метаболитни възможности да синтезират разнообразни биологична активни вещества.

Една от главните задачи понастоящем на приложната микробиология е разработването на стратегии и методи за откриване на нови микробни метаболити. При търсенето на такива микробни метаболити изследователите се насочват към изолиране на микроорганизми от специфични, малко изучени местообитания.

Антрактика е местообитание, което отговаря на този критерий. Интересът към това местообитание силно нараства в последните години по обясними причини. Прокариотите доминират в много антарктически екосистеми и играят важна роля в биогеохимичните цикли и минерализирането на мъртвата органична материя. Изследвания върху характера на биоценозите, микробното разнообразие, метаболитната активност на доминиращите видове, участието им в трансформацията на материята при специфични климатични условия представляват сериозен научен интерес.

В този смисъл представената дисертация е по **особено актуален проблем** с важно фундаментално значение и възможности за практическо приложение.

2. Оценка на структурата на дисертационния труд

Дисертационният труд е написан на 187 стандартни страници А4 и съдържа 19 таблици и 49 фигури. Трудът е структуриран по стандартната схема - увод, литературен обзор, цел и задачи, материали и методи, резултати и обсъждане, обобщение, изводи, приноси, литература като отделните раздели са в добро съотношение. Написан е на добър научен стил, с точно използване на терминологията което показва, че докторантката познава професионално материята.

В библиографската справка са включени 404 източника, предимно на английски, главно от последните години, включително и такива от 2015 г., което е показател за отличната осведоменост на докторантката по проблема.

2.1 Литературен обзор

Литературният обзор е написан на 38 страници и е структуриран в три основни раздела. Той започва с характеристика на континента Антарктида, в който подробно се разглеждат климатичните и релефните особености, почвените типове, флората и фауната. Специално внимание е отделено на микрофлората. Логично продължение на обзора е описанието на остров Ливингстън и неговите почвени хабитати. Подробно са разгледани почвените микроорганизми, тяхната численост, таксономичният им статус и метаболитната им активност.

В самостоятелен раздел е разгледана биологията на актинобактериите. Специално внимание е отделено на въпроси, свързани с таксономичния им статус, подходите при идентификацията им – класическа и молекулна. Съществена част на този раздел е анализът на биологичноактивните вещества, продуцирани от актиномицети и ролята им в биологичния контрол на болести по растенията.

Информацията е представена с отличен научен стил, цитирани са значителен брой автори, работещи по проблема и изложеното в обзора е добра аргументация на необходимостта от провежданите от авторката изследвания. Очевидно е, че дисертантката познава в детайли проблема, в състояние е да оценява правилно литературните данни, да ги интерпретира и излага по подходящия начин. Задълбочено и критично са разгледани проблемите, свързани с таксономичния статус на актиномицетите, възможностите на съвременните методи на молекулната таксономия за идентификацията им. Ясно е аргументирана необходимостта от изследванията на тази група микроорганизми, обитаващи

специфичното местообитание остров Ливингстън и потенциалната възможност изолатите да продуцират нови активни вещества, представляващи интерес.

2.2. Цел и задачи

Основната цел на дисертацията е охарактеризиране на актиномицети, изолирани от остров Ливингстън и изследване на техният антагонистичен потенциал. Целта е ясно и точно поставена. За реализирането ѝ са формулирани четири основни задачи, следващи логично като две от тях са детайлизирани с по няколко под задачи.

2.3. Материали и методи

Това е важна част от дисертационния труд, която показва нивото на проведените научни изследвания. Представени са съвременни микробиологични, биохимични и молекулно генетични методи, които са адекватни на поставената цел и които осигуряват едно прецизно изпълнение на задачите. Методите са описани точно, ясно без излишни подробности. Комбинирането на различни методи дава възможност докторантката не само да получи нови знания, но и да придобие умения за комплексно решаване на поставените научни задачи.

2.4. Резултати и обсъждане

Получените резултати докторантката представя последователно съгласно поставените задачи в няколко раздела. Логично първият от тях е свързан с изследване на почвите на остров Ливингстън. Направена е физикохимична характеристика като са анализирани рН, съдържание на влага и на хумус. На базата на високото водно съдържание дисертантката прави логичния извод, че това драстично може да промени условията на средата в сравнение с останалите почви като благоприятства процесите на сорбция и десорбция, дифузия на по-голямо разстояние, както и възможност в по-голяма дълбочина да се появят анаеробни джобове, където може да протече анаеробно разграждане на органиката. Важни заключения за потенциално присъствие на определени групи микроорганизми са направени и на базата на установените стойности на рН. В този смисъл в изследваните антарктически почви може да се очаква по-ограничено развитие на микроорганизмите с по-тесен диапазон на рН.

Микробиологичният анализ на почвите показва присъствие на хетеротрофни (олиготрофни и копиотрофни) бактерии като е установена връзка между типа на почвения образец, растителността и количеството на бактериите. Получените

резултати са сравними с тези на друга автори, анализирали този тип почви. Количеството на актиномицетите е приблизително еднаква за всички почви като те представляват около 80% от общия брой на копиотрофните бактерии, което се обяснява с устойчивост към засушаване и по-широка трофична ниша.

За по-голяма достоверност на резултатите дисертантката избира интересен подход – изолиране на тотална ДНК и провеждане на PCR-амплификация с родовоспецифични праймери (StrepB/StrepE) за р. *Streptomyces kato* най-често срещани представители на актиномицетите в почвите. При тези анализи се позитивира фрагмент около 500 bp дори и в почвените образци, от които не са изолирани стрептомицети по култивиационните методи.

Важен раздел на резултатите е този, свързан с изследване на физиологичния потенциал на почвите, определен чрез системата Biolog EcoPlates. Тя дава възможност да се сравни относителният капацитет на различните почви за усвояване на голям брой природни въглеродни субстрати. Въпреки забелязаните разлики, при всички почви степента на метаболитна активност е ниска (максимална активност на 8 ден - 0.65 OD) в сравнение с почвите от умерените географски ширини, където тази оптична плътност се достига още на 2 -3 ден от началото на култивирането. Дисертантката прави логичния извод, че по-бавното асимилиране на въглеродните източници се дължи на преобладаването именно на бавно развиващите се актиномицети в състава на почвените копиотрофни съобщества. На базата на данните от тези анализи са установени и предпочитаните въглеродни източници както и връзката на тези източници с растителната покривка на съответния тип почва. Данните от тези изследвания са анализирани компетентно на базата на налични изследвания от други автори и са направени важни изводи за специфичния хранителен пул на антарктическите почви и наличието на хабитат специфични адаптации към съответни въглеродни източници. Резултатите на дисертантката потвърждават хипотезата, че типът на растителната покривка или нейното отсъствие допринася за специфичността за усвояване на въглеродни източници от бактериите и физиологичното разнообразие на съобществата. Тези резултати имат съществен фундаментален принос за екологията на специфичните местообитания с ниски температури каквито представляват обектите на изследване.

Следващ етап в работа на дисертантката е свързан с изолиране и идентифициране на актиномицети от изследваните почви. Изолирани са общо 96 щама. След вторичен разсев на новоизолираните щамове и анализ на морфологията на колонииите са селектирани 21 морфологично различни изолати, които заедно с 9 почвени антарктически щамове, предоставени от колекцията на катедрата по Обща и промишлена микробиология са обект на следващи изследвания.

Осъществена е полифазна таксономична характеристика на изолираните актиномицети на базата обстойна фенотипна характеристика – макроморфология, микроморфология (форма на спороносните хифи и морфологията на споровата повърхност), морфолого-културални и физиолого-биохимични характеристики и методи на молекулната таксономия. Направената фенотипна характеристика на изолатите е подробна, извършена прецизно и изключително добре онагледена с подходящи таблици и снимки. Данните са подложени на йерархичен клъстерен анализ за групиране на видовете на базата на тяхното сходство по фенотипни признаци и е установено, че се формират седем клъстера, които обединяват различен брой щамове. Най-голям е първият, който групира 8 щама, усвояващи различни въглеродни източници и извити или отворени по форма спороносни хифи, продуциращи меланинов пигмент. Останалите кластери включват по няколко изолата, обединени на базата на един или повече фенотипни признаци. Всички щамове са скринирани за продукция на протеолитични и амилолитични ензими. Особено интересен е фактът, че 19 от тях притежават амилолитична активност като девет от тях представляват съществен интерес тъй като са активни продуценти на ензима, активен и при ниски температури. В този смисъл тези резултати освен фундаментална стойност имат и потенциал за практическо приложение. Резултатите от фенотипната характеристика на изолатите са със съществен принос за таксономията на тази специфична група бактерии.

Молекулно-генетична характеристика и генотипирането на изолираните актиномицети е осъществено с умело подобрени методи на молекулната таксономия с висока дискриминативна способност. Първоначално е потвърдена таксономичната принадлежност на щамовете чрез PCR с родовоспецифични праймери за род *Streptomyces*. При 27 от анализираниите 30 щама с праймери StrepB/StrepE е амплифициран продукт с дължина около 520 bp, характерен за род

Streptomyces За останалите три щама е проведена PCR амплификация със специфични праймери за родовете *Pseudonocardia*, *Streptomonospora*, *Saccharomonospora*, *Gordonia* и *Nocardiosis*.

За провеждане на ARDRA анализ на 16S рДНК на изолираните актиномицети е приложен бърз метод за идентификация на филаментозни актиномицетни родове на базата на рестрикция на гена за 16S рРНК чрез използването само на четири рестрикрази. Рестрикцията с TaqI разделя двадесетте щама, чиято ДНК е амплифицирана с универсалните праймери 12 различни профила. Седем от стрептомицетните щамове формират един и същи профил, който съдържа 6 фрагмента, част от изолатите формират профил с 4 фрагмента а останалите - различни помежду си профили. Десет щама, чиято 16S рДНК е амплифицирана с универсални праймери 27f/1492г се разпределят в 8 профила. Три от тях обединяват в профил I, който има 5 фрагмента Останалите седем щама генерират различни помежду си и се отделят самостоятелно. Рестрикцията с ензима HinBI на щамовете, амплифицирани с двойката праймери 9f/1542г, потвърждава тяхното разпределение по профили, установено с ензима TaqI с известни изключения

От проведения анализ дисертантката показва, че двата ензима - TaqI и HinBI имат еднаква дискриминативна способност и на базата на проведения рестрикционен анализ би могло да се предположи, че изолираните щамове са представители на приблизително 21 вида филаментозни актинобактерии, толкова колкото са формираните профили. Представените резултати имат съществена научна стойност. Те са не само с потвърдителен характер, но имат и оригинална стойност.

Видова идентификация на актиномицетните щамове е осъществено чрез секвениране на гена за 16 S рРНК. Успешно са секвенирани петнадесет от щамовете. Секвенционният анализ потвърждава с висок процент на сходство принадлежността на 13 от тях към род *Streptomyces*. Три от изолатите са идентифицирани като *Streptomyces fildesensis*, признат като нов вид през 2011 г. Един от щамовете е представител на вида *Streptomyces tendae*, признат за нов вид през 2008 г, а останалите са отнесени към видовете *Streptomyces griseoplanus*, *Streptomyces polyantibioticus*, *Streptomyces costaricanus*. Идентифицираните до вид актиномицетни щамове представляват интерес, тъй като притежават специфична

антибактериална активност както и протеолитична и амилолитична активности при 28 °С.

Секвенционният анализ потвърждава принадлежността на два от щамовете към р. *Nocardiosis*, вид *Nocardiosis dassonvillei*. Този вид е изолиран от изключително разнообразни хабитати, включително антарктически морски седименти и е продуцент на студоустойчива α -амилаза.

Отличното познаване на литературата по проблема и добрата методична подготовка на дисертантката й позволяват да направи обстоен анализ на получените резултати и критична оценка на дискриминативната способност на методите и получените резултати. Всъщност резултатите от тези изследвания имат съществени фундаментални приноси както на биологията на тези относително нови видове актиномицетни щамове, недостатъчно добре изучени така и за методологията на полифазната таксономия.

Следващ етап в работата на докторантката е свързан с оценка на метаболитния потенциал на изолираните актиномицетни щамове за синтеза на антибиотици. Дисертантката е провела скрининг за функционални гени, кодиращи синтеза на антибиотици чрез PCR–амплификация със специфични праймери. Този скрининг е осъществен за 4 типа гени - за синтеза на нерибозомална пептидна синтетаза (NRPS) и поликетидна синтаза тип I (PKS-I), за синтеза на тип II поликетиди, за гликопептидни антибиотици и полиенови антибиотици. На базата на проведенния PCR скрининг и получените резултати, анализиранияте щамове са обединени в няколко групи въз основа на техния потенциал да синтезират различни биоактивни вещества. Един от изолатите притежава гени за синтеза на почти всички изследвани групи антибиотици, с изключение на поликетиди тип I. Девет изолата притежават гени за синтеза на три групи от изследваните пет групи антибиотици, седем за синтеза на пептидни, тип II поликетидни и полиенови антибиотици. Шест от изолатите притежават гени за синтеза само на пептидни и поликетидни тип II антибиотици. Един изолат притежава потенциал единствено за синтеза на пептидни антибиотици. На базата на получените резултати и техния анализ дисертантката прави извод, че изследваните актиномицетни щамове притежават висок биосинтетичен потенциал по отношение на антибиотици. Тези резултати

имат както фундаментална стойност така и реална възможност за бъдещо практическо използване.

Последен етап в работата на дисертантката е свързан със скрининг на актиномицетните щамове за антибактериална активност срещу фитопатогенни бактерии. Тринадесет от щамовете показват различна степен на антибактериално действие срещу причинителите на бактерийното струпяване по домати и пипер – видовете *X. vesicatoria*, *X. euvesicatoria*, *X. gardneri* и *X. perforans*. Скрининг на актиномицетите за антибактериална активност е проведен и след периодично култивиране в течни среди и за определяне на активността им са използвани както филтрати от културалната течност така и екстракти от мицела. При 10 от щамовете антибактериална активност имат както филтратите от културалната течност така и екстрактите от мицела, като различията в активността между тях не е значителна. При осем от щамовете активните вещества се отделят само в културалната среда, а при два антибактериалните вещества се натрупват само в мицела, от който се екстрахират. От фитопатогенните бактерии най-голям брой антагонисти има *X. euvesicatoria* следвана от *X. vesicatoria* и *X. gardneri*. Получените резултати потвърждават установеното и от други автори, че почвите на Антарктика биха могли да се използват като източник на продуценти на антимикробни вещества с актиномицетен произход. Като последен етап в работата е направеното първично характеризирание на антибактериалните вещества, синтезирани от актиномицетните щамове чрез сравняване на спектрите на метанолови екстракти от мицела в УВ и видимата област. Анализът на спектрите показва, че при повечето от щамовете поглъщането е предимно в ултравиолетовата област. Интерес представляват спектрите на четири от щамовете, при които се наблюдава и поглъщане между 410 и 450 nm, характерно за актиномицините - група антибиотици с полипептидна природа и антитуморно действие. Тези щамове проявяват и най-висока антимикробна активност при *in vitro* условия срещу различни тест-бактерии.

Проведени са и изследвания *in vivo* антимикробно действие на три щамове срещу три вида фитопатогени – *X. vesicatoria*, *X. euvesicatoria* и *X. gardneri* – основни причинители на бактерийното струпяване по домати и пипер в България. Проведените изследвания чрез третирането в *in vivo* условия на семена

от пипер имат съществена стойност в стратегията за биологичния контрол в растителната защита.

Дисертационният труд завършва с обобщение, което отново потвърждава отличната подготовка на дисертантката, детайлното познаване на проблема и уменията ѝ да интерпретира и анализира получените резултати.

2.5. Изводи и приноси

На базата на проведените експерименти по поставените задачи са формулирани 11 извода. Те са логично следствие от проведената експериментална работа и напълно отразяват получените резултати.

Посочени са и 4 приноси. Тези приноси, макар и скромно посочени от докторантката имат фундаментален характер и съществено значение за изучаване на биоразнообразието на остров Ливингстън и имат пионерен характер. Те представляват съществен принос в изследванията на местообитанията с ниска температура и биогеохимичните процеси в тях. Освен фундаментален характер приносите на докторантката (№ 3 и 4 особено) могат да бъдат основа за търсене на нови антибиотици както и за разработване на стратегия за борба с бактериалното струпясване по важни селскостопански култури.

3. Участие на докторанта в изработването на дисертацията

Докторантката е разработвала дисертацията си предимно в катедрата по Обща и приложна микробиология. Личните ми впечатления ми дават основание да считам, че изпълнението на дисертационния труд е напълно нейно дело.

4. Публикации, участия в научни форуми и проекти

Дисертантката е представила списък с публикации по темата както следва: две публикации в международни списания с импакт фактор, една в българско списание с импакт фактор, една в българско списание без импакт фактор, една в книга, **или общо 5 публикации.**

Резултати от дисертацията са докладвани на 4 научни форума (1 международен и 3 национални) под формата на доклади и постерни съобщения.

Докторантката е участвувала в пет научни проекта, които имат отношение с темата на дисертацията.

Представен е и списък на цитирания на трудове на докторантката (общо 4 цитата), което още веднъж потвърждава значимостта на проблема и актуалността резултатите, които докторантката е получила. Важен е и фактът, че една от

публикациите на докторантката е наградена като най-добра публикация на млад учен на Фондация „Стефан Ангелов“ за 2013, а два от представените от нея постери са получили първа награда.

5. Препоръки, забележки и въпроси

Дисертационният труд е оформен перфектно, не са допуснати съществени технически грешки поради което е трудно да се направят забележки. Естествено има незначителни стилни неточности, които обаче в никакъв случай не намаляват достойнствата на труда.

Към докторантката имам следните въпроси :

1. Как може да се обясни фактът, че изолираните от Вас актиномиценти щамове не проявяват афинитет към предпочитаните от другите хетеротрофни микроорганизми захари като източник на въглерод и енергия ?

2. Как бихте класифицирали Вашите изолати по отношение на изискванията към оптимална температура – факултативни психрофили, облигатни мезофили или факултативни мезофили ?

3. Бихте ли обяснили смисъла на заглавията на фиг. 12 (стр. 79) и фиг.13(стр. 81) в дисертационния труд.

4. Какъв алгоритъм бихте предложили при бъдещи изследвания за скрининг на продуценти на нови антибиотици ?

6. Придобита компетентност в съответствие с изискванията на образователната и научна степен „доктор“

Представеният дисертационен труд е едно завършено изследване, което предоставя ценна научна информация и разкрива възможности за практическо приложение. Смятам, че обемът на тази дисертация надхвърля изискванията, получените резултати имат фундаментални и научно-приложни приноси.

Авторефератът е изготвен съгласно изискванията и отразява вярно основните резултати и изводи на дисертационния труд.

Изхождайки от изложеното мога да обобщя, че са изпълнени основните цели на докторантурата – образователна и научна. Дисертацията е разработена на високо научно ниво и изцяло отговаря на изискванията. Очевидно е, че докторантката е придобила значителни компетенции, усвоила е широк набор от съвременни методи, изградила се е като отличен експериментатор и млад

специалист с големи потенциални възможности за развитие. Имам лични впечатления от докторантката още като студентка и това ми дава право да отчета нейното развитие като отлично подготвен млад специалист, за което имат несъмнено принос и нейните научни ръководители.

Дисертационният труд има сериозни приноси. Приносите могат да се групират като такива с подчертано фундаментален характер, приноси с потвърдителен характер, оригинални приноси и такива с потенциална възможност за практическо приложение.

Като по-съществени считам тези, свързани с определянето на физиологичния профил на почвите от остров Ливингстън, установените физиологични особености на изолираните актиномицетни щамове, обстоятния рестрикционен анализ и изводите от него, изследванията върху биосинтетичния потенциал на щамовете и данните за типа на синтезираните антибиотици както и тези, свързани с антибактериалния ефект на щамовете срещу причинителите на бактериалното струпяване по пипера.

Получените резултати са от съществен интерес за специалисти в различни области – еколози, занимаващи се с проблеми на биологичното разнообразие в специфични екосистеми каквато представлява остров Ливингстън - микробиолози, занимаващи се с проблеми, свързани с търсене на нови антибиотици и биологично активни вещества както и специалисти по растителна защита, работещи в направление по биологичен контрол.

Изложеното по-горе ми дава основание да считам, че дисертацията е на високо ниво, придобити са компетенции в съответствие с изискванията и горещо препоръчвам на научното жури да оцени достойнствата на дисертационния труд и да присъди на Марта Никифорова Енчева- Малинова Образователната и научна степен „Доктор”.

02.03. 2016.

Рецензент :
(Проф. д-р Венета Грудева)