

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд на тема: „Микробна колонизация на скалните рисунки в Магурата и стратегия за ограничаването на деструкционния ѝ ефект“

представен за придобиване на образователната и научна степен „Доктор“, по професионално направление 4.3. Биологически науки (Микробиология) на редовния докторант към Катедра „Обща и промишлена микробиология“ към Биологическия факултет при Софийски университет Св. „Кл. Охридски“, София, **Милена Миленова Митова**

Рецензент: проф. д-р Елена Иванова Георгиева – ИФРГ-БАН, заповед № РД 38–73/31.01.2017

Пещерите в Република България са национално богатство. Те са многобройни, но пещерата Магура се отличава с нейните древни, уникални, скални пещерни рисунки датиращи от период между енеолита и началото на ранно-бронзовата епоха. Изображенията са с разнообразна тематика и са нарисувани с прилепна тор. Магурата е обявена за национално богатство и е под защитата на ЮНЕСКО. Тя представлява световен и национален интерес и наличието на информация за характера на микробиоценозите в нея е задължително за опазването на това културно богатство. Напоследък, в редица публикации се постулира търсенето на „консервирани“ в подземната среда реликтови геноми, които вероятно могат да притежават както уникални свойства за биотехнологиите, така и да носят информация за хода на биологичната еволюция. В контекста на казаното дисертационният труд на Милена Митова е фокусиран върху изключително важен за науката и практиката проблем, а именно да се анализира бактериалната контаминация в пещерата Магура и да се получи информация, както за характера на микробиоценозите в нея, така и да се даде стратегия за опазването на това национално културно богатство.

Дисертационният труд е написан на 177 стандартни страници. Богато онагледен е с прекрасни информативни 29 фигури и 41 таблици и включва: Увод, Литературен обзор, Цели и задачи, Материали и методи, Резултати, Обсъждане, Изводи и Приноси. В библиографската справка са включени 472 заглавия, всички на латиница. Тези източници обхващат сериозен период от развитието на научния проблем в световен мащаб и отразяват задълбочено познаване на постиженията от последните 5-10г.

В *Увода* е обоснован изборът на тема и нейната актуалност, а също и неизяснените проблеми причина за противоречиви резултати. Сериозните проблеми, обект на дискусия са свързани с начините на пробовземането, условията на

култивиране, методите на идентификация, подходите за реставрирането на увредените участъци и общите принципи на стратегиите за опазването на тези произведения.

Литературният обзор обхваща почти 50 стр. Той е написан компетентно и задълбочено на много добър професионален български език и е илюстриран с отлични информативни фигури и таблици. В него е дадена задълбочена характеристика на пещерите като екосистеми, на спелеомикрофлората и в частност на Магурата. Описани са бактерии, актиномицети, гъби и археи като компонент на спелеомикрофлората. В детайли е разгледана ролята на микроорганизмите в спелеогенезиса, както и механизмите на биодетериорация на скали и скални материали. Описани са методите за контрол на биодетериорацията, за изолиране и идентификация на биодетериогени в пещери и молекулни техники за идентификация. Висока оценка заслужава направеното от Митова обобщено заключение на обзора, от което е видно нейната висока компетентност и умения да борави свободно с проблемите на пещерите. От изложеното става ясно, че докторантката оценява творчески литературния материал и в резултат на това логично стига до целите и задачите, които си поставя за разрешаване.

В раздела „Цели и задачи“ ясно е формулирана целта на настоящата дисертация и са описани конкретните задачи, които трябва да се изпълнят, за да бъде тя постигната. Целта е да се проучи спелеомикрофлората на пещерата Магура, като се акцентира върху микрофлората в Галерията с рисунките и се предложи стратегия за опазването им. За постигането на тази цел, Митова е планирала конкретни доказателствени анализи. Те са многобройни и включват качествен и количествен анализ, микробиологичен мониторинг на спелеомикрофлората на пещерата, изследване на антагонистичните взаимоотношения между бактерии и актиномицети, идентификация на преобладаващите физиологични и систематични групи микроорганизми, както и разработване на стратегия за опазването на уникалните скални рисунки. Резултатите от това задълбочено изследване биха могли да бъдат основа за създаване на насока за използването на пещерите като естествена придобивка, включваща максимален брой от туристи и честота на посещения. Темата на този дисертационен труд е важен и сполучлив опит да се изготви дългосрочна програма за мониторинг на микроклимата, влиянието на околната среда и микробните съобщества в пещерите. Тя е свързана не само с научното развитие на проблема, но дава и нова алтернатива за бъдещи проучвания. Подходът определено показва актуалността на поставения научен проблем и избраният път е принос в разрешаването му. Искам да отбележа, че така поставените задачи покриват и дори надхвърлят обема на една докторска работа.

В следващия раздел последователно и в детайли са описани използваните в дисертацията „Материали и Методи”. Отличната професионална подготовка на Милена Митова се потвърждава и от широкия спектър от усвоени, компетентно описани и адекватно приложени съвременни микробиологични, генетични, микроскопски, клетъчно-биологични и молекулярни техники, които безспорно ще дадат отговор на конкретно поставената цел и задачи. В дисертационния труд са използвани както рутинни микробиологични методи, като изолиране на чисти култури и съхранение на изолатите, методи за доказване на таксономичната им принадлежност, класически методи за идентификация, така също и съвременни молекулярно генетични методи, като изолиране на ДНК, PCR, RAPD, RFLP, FISH, HPLC, градиентна електрофореза в денатуриращи условия, секвениране на ДНК последователности, биоинформатичен анализ, молекулна идентификация на бактеријни, актиномицетни и гъбни изолати и др. Те са описани професионално и достатъчно подробно във всички етапи. Това е една от гаранциите за достоверност на резултатите и дава възможност за възпроизвеждането им в други лаборатории. Докторантката е провела и удачни процедури по оптимизиране условията за извеждане на почти всички методи. Този комплексен подход, приложен от Митова, дава възможност за задълбочено проучване и разрешаване на научните задачи и получаване на достоверни отговори на поставените от нея цел и задачи.

В раздела „Резултати и обсъждане” са дадени добре оформени доказателствени данни на поставените за разрешаване задачи. Тази част от дисертационния труд се състои от 7 глави с няколко подраздели, съответстващи на правилно дефинираните задачи. Отлично впечатление прави обсъждането на резултатите. Докторантката е успяла критично да съпостави собствените си резултати и да им намери достойно място сред огромния обем публикувана световна литература, което е показател за нейната ерудиция и висока научна подготовка. Получените резултати дефинират логична последователност от изследователски решения започващи със визуален оглед на Галерията с рисунките и определяне на точките на пробовземане, количествена характеристика и мониторинг на микробните съобщества в пещерата.

Първа и много важна стъпка в изследванията на докторантката е вземането на проби от Галерията с рисунките и от някои други галерии, осъществено в съответствие със стандартните изисквания за микробиологичен анализ. Проби са взети от места със следи от възможна биодеградираща активност. Местата на пробовземанията са чудесно онагледени. За изолиране на чисти култури от бактерии, актиномицети и гъби и тяхната идентификация по фенотипни признаци и молекулна таксономия, са използвани голям

брой различни елективни и селективни хранителни среди. След изолиране на чисти култури обект на следващи изследвания са 108 изолата от бактерии, 15 изолата от актиномицети и 78 гъбни изолата, както и детайлна оценка на метаболитната активност на тези видове за определяне на типа на техния деструктивен ефект. Като обект на изследване са подбрани 17 групи микроорганизми, представляващи интерес за отчитане на микробиологичната компонента в галерията и те са както следва: хетеротрофни бактерии, олиготрофи, облигатни психрофили, факултативни психрофили, спорообразуващи бактерии, амонификатори, нитрификатори, денитрификатори, уробактерии, силикатни бактерии, неутрофилни железобактерии, ацидофилни железобактерии, ацидофилни тионови бактерии, неутрофилни тионови бактерии, сулфат-редуциращи бактерии, актиномицети и гъби. Резултатите от проведения мониторинг на микробиоценозата, дефинитивно са показали, че в Галерията с рисунките е формирано стабилно микробно съобщество, като се запазва преобладаващото присъствие на факултативните психрофили, спорообразуващите и силикатните бактерии, амонификаторите, денитрификаторите, актиномицетите и гъбите.

В следващия раздел, чрез методите на класическата таксономия, включващи морфологични, физиологични и биохимични свойства, в детайли докторантката е идентифицирала бактериалните изолати, които на следващ етап тя ги е подложила и на електронно-микроскопски анализ, имащ за цел потвърждаване на наблюдаваната клетъчна морфология. От грам-положителните бактерии таксономично 14 изолата Митова ги е определила към род *Bacillus*, три към род *Sphingobacterium*, а един като представител на род *Enterococcus*. При грам-отрицателните бактерии докторантката е установила, че изолатите таксономично принадлежат към род *Pseudomonas*, *Serratia*, *Enterobacter* и род *Klebsiella*. За потвърждаване на данните от класическата таксономия Митова е направила идентификация на изолираните бактерии, чрез методите на молекулната таксономия. За целта тя е използвала PCR амплификация на 16S рДНК, секвениране на ДНК амплифицираните продукти, последвано от биоинформатичен и филогенетичен анализ на получените секвенции. Прецизно анализиранияте резултати от тези експерименти са дали възможност на докторантката да установи, че изолираните бактериални щамове принадлежат към 8 рода, а именно: *Bacillus*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Sphingobacterium*, *Pantoea*, *Pseudomonas* и *Raoultella*.

Следващата логично поставена задача от докторантката е да направи идентификация на изолираните чисти култури актиномицети, отново прилагайки

методите на класическата и молекулна таксономия. Обект на изследване са 15 щама изолирани от Галерията с рисунките и Входната галерия. Идентификацията, чрез молекулната таксономия, е извършена чрез изолиране на представителна ДНК, PCR амплификация на 16S рДНК със специфични за род *Streptomyces* праймери, секвенционен, биоинформатичен и филогенетичен анализ на получените PCR продукти. Анализите са показали, че изолираните актиномицетни видове принадлежат към родовете *Streptomyces*, *Kocuria*, с преобладаващ вид *K. rhizophila* и *Promicromonospora*, с преобладаващ вид *P. flava*.

Следват убедителни експериментални доказателства, задълбочена и убедителна интерпретация за идентификацията на изолираните гъбни култури. Чрез методите на класическата и молекулната таксономия и на базата на макро- и микро- морфологични характеристики Митова е идентифицирала до род гъбното разнообразие, в пробите от рисунките, което включва присъствие на 21 рода. Според филогенетичния анализ в гъбните съобщества доминират представители на *Ascomycota* (81%) (родове *Penicillium* и *Aspergillus*), *Basidiomycota* (род *Trichosporon*) и *Zygomycota* (родовете *Mucor* и *Mortierella*), като преобладаващ е родът *Penicillium* и видовете *P. commune*, *P. solitum* и *P. malachiteum*. Резултатите са показали, че видовете изолирани от пещера Магура, включват гъби с антропогенен произход. От всички пещерни микроорганизми гъбите са най-притеснителни поради високата продукция на спори и тяхното лесно разпространение и това могат да бъдат причините за ниското разнообразие в Галерията с рисунките. Доказателство за огромния експериментален труд на Митова са депозираните и приети за публикуване в European Nucleotide Archive 36 секвенции на анализирани гъбни изолати. За потвърждаване на гъбното разнообразие в пещерата докторантката е провела и денатурираща градиентна гел електрофореза (DGGE). За целта тя е използвала гъбни изолати, проби от седименти, богати на гуано и проби от скалната повърхност, в близост до Галерията с рисунките. DGGE анализът е показал относително високо разнообразие на гъбните съобщества в субстратите от прилепното гуано. Резултатите от изследванията на гъбното разнообразие в Магура са показали, че в този хабитат присъстват представители на гъбите, характерни за голям брой карстови пещери.

Една амбициозна задача, която си е поставила докторантката е да изследва инхибиращия ефект на различни биоциди върху чисти култури бактерии, актиномицети и гъби. Получените резултати са показали, че активността на биоцидите е различна. Митова е установила, че биоцидите тимол, меден сулфат и сребърен нитрат имат

инхибиращ ефект спрямо бактериалните изолати, като най-силен е този на медния сулфат, докато спрямо актиномицетните изолати инхибиращ ефект проявяват меден сулфат, Превентол RI50 и Fennosan R20, а срещу гъбните изолати най-силно изразен инхибиращ ефект е установен за Превентол RI50, Фенозан R20 и 2-октил-4-изотиазолин (OIT), като най-чувствителни са изолатите от род *Penicillium*. Относно пещерата Магура за първи път са представени данни за инхибиращия ефект на 8 биоцида спрямо бактериални, актиномицетни и гъбни изолати, които могат да бъдат използвани при мероприятия по консервация на рисунките. Митова е доказала, че единствено тимолът е подходящ за обработка на скалните изображения в изследваната галерия. Причините за това са, че посоченото съединение е прозрачно, безцветно, потиска бактериалния растеж в ниски концентрации и не уврежда рисунките.

Друга съществена и важна група от експерименти Митова е фокусирала върху изработване на стратегия за опазване на скалните рисунки, която може да се сведе до няколко основни изисквания, а именно запазване на относително постоянните физико-химични параметри в Галерията с рисунките, периодичен микробиологичен контрол на определени групи микроорганизми, регулиран поток на туристи, а при възникване на активна микробна контаминация внимателно третиране с биоциди, задължително след консултация с реставратори.

Получените резултати от Митова са обобщени в 11 извода и 5 приноси. Тя е представила и списък от 7 публикации, отразяващи съществени части от получените от нея резултати, който съдържа една публикувана статия в реферирано международно списание с **ИФ 1.55**, четири статии в пълен текст в национални реферирани конференции, две статии изпратени за публикуване, но все още без отговор от редакцията. В шест от публикациите Митова е първи автор, което показва нейната водеща роля при изработването на статиите. По темата на дисертацията тя е дала и списък от 9 участия в престижни научни национални форуми с международно участие. Докторантката е участвала в изпълнението на четири научни проекти.

Приемам представените от автора изводи и приноси, които са в съгласие с получените резултати и отразяват оригиналността на разработката.

Накрая искам да задам следните въпроси на докторантката: Може ли от получените анализи да се даде информация за хода на биологичната еволюция на микробиоценозите? Ако възникне интензивна колонизация на рисунките как трябва да

се процедурира и кой от изпитаните биоциди може да се препоръча? Как тези резултати и предложената стратегия ще бъдат използвани за запазването на рисунките в пещерата.

Заключение. Дисертационният труд на Милена Миленова Митова е актуален, с ясно поставени цели и задачи, осъществени с използването на модерни методи, хипотези и анализи, които са нейно лично дело. На базата на огромен брой експерименти тя е получила оригинални резултати с безспорни научни и научно-приложни приноси, голяма част от които са вече публикувани в реферирани национални и международни списания. С този труд тя демонстрира висока компетентност, формулиране, дизайн и планиране на експеримент, анализ и интерпретация на научни резултати. Считаю, че Милена Митова е със задълбочени знания не само в областта на микробиологията, но и на молекулярната биология и генетика.

Този научен труд отговаря напълно на изискванията на ЗРАСРБ и Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и за заемане на академични длъжности в СУ Св. „Климент Охридски“, гр. София. Имайки предвид високите професионални качества и научни постижения на Милена Митова, убедено препоръчвам на уважаемото Научно Жури да ѝ присъди образователната и научна степен “Доктор”.

27.02.2017

Гр. София

Рецензент:

/Проф. доктор Елена Георгиева/