

РЕЦЕНЗИЯ

от **проф. Георги Ангелов Милошев**,
Ръководител на Лаборатория по молекулярна генетика, епигентика и дълголетие
Институт по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“, БАН

на дисертационния труд на
Радина Николаева Николова

на тема:

**„Структурни и функционални характеристики на почвените микробни съобщества в
отговор на дълготрайно замърсяване с тежки метали“**

за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“
в област на висше образование 4. “Природни науки, математика и информатика”,
професионално направление 4.3. “Биологични науки”,
научна специалност “Молекулярна генетика”
Институт по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“, БАН

1. Основание за изготвяне на рецензията

Настоящата рецензия е изготвена в изпълнение на Заповед № 143-ОБ от 28.08.2025 г. на Директора на ИМБ „Акад. Румен Цанев“ за назначаване на Научно жури за провеждане на публична защита на дисертация на тема „ Структурни и функционални характеристики на почвените микробни съобщества в отговор на дълготрайно замърсяване с тежки метали“, представен от Радина Николаева Николова, редовен докторант към секция „Регулация на генната активност“. Дисертацията на докторант Радина Николаева Николова е представена на разширено заседание на секцията, проведено на 29.07.2025 г. След обсъждане тя е насочена към процедура за публична защита.

Рецензията е изготвена в съответствие с изискванията на чл. 9, чл. 30, ал. 3 от правилника за приложение на ЗРАСРБ и протокол от заседание на НС на ИМБ № 13 от 28.08.2025 г.

2. Данни за дисертационния труд

Работата по дисертацията е изпълнена под научното ръководство на доц. **Галина Радева** и проф. **Анелия Кенарова**.

Дисертационният труд е представен в обем **170 страници** основен текст, съдържащ богата визуализация – **27 фигури, 33 таблици**. В допълнение е представено подробно **Приложение**, включващо 12 таблици, списък на съкращенията и цитирана литература, включваща повече от **300 източника**.

Авторът Радина Николова представя резултати от комплексни изследвания, обединяващи:

- класически микробиологични анализи;
- ензимни тестове и функционални профили;
- молекулярно-генетични методи (PCR, qPCR, клонови библиотеки);
- таргетно ампликон секвениране на 16S рРНК гена на бактериите и ITS региона, намиращ се между гените за 18S рРНК и 26S рРНК при гъбите;
- биоинформатични анализи и статистически модели.

Публикациите по темата, научната активност и участието в проекти допълват общата оценка на тази сериозна научноизследователска работа.

3. Актуалност и значимост на темата

Замърсяването на почвите с тежки метали е глобален екологичен проблем, който представлява постоянен риск за здравето на хората и околната среда. Научната общност разпознава микробиома като чувствителен и ранен индикатор за промени в здравето и функционалността на почвите. В България обаче липсват изследвания, които да използват метагеномен подход за анализ на микробните съобщества в трайно замърсени почви.

Настоящата дисертация адресира именно този проблем, като за първи път в национален мащаб комбинира класически и модерни метагеномни техники, анализира както бактериални, така и гъбни микробни съобщества, оценява структурните и функционални адаптации при хронично замърсяване с тежки метали и интегрира физико-химични фактори с топография и биотични взаимодействия.

Темата притежава ярко изразена екологична, научна и социална значимост, а резултатите имат потенциал за приложение в биомониторинга, екосистемното управление, оценката на риска и биоремедиацията.

Актуалността на настоящата научна разработка е безспорна, а подходът – съвременен и научно оправдан.

4. Цели и задачи на изследването

Основната цел на дисертационния труд е комплексно изясняване на структурните и функционални характеристики на почвените микробни съобщества в условия на дълготрайно замърсяване с тежки метали, чрез интеграция на молекулярни, микробиологични, биохимични и биоинформатични методи. Задачите са прецизно формулирани и логически следват целта. Тези задачи включват: определяне на концентрациите на основните тежки метали в почвите; характеристика на ключови физико-химични показатели; определяне на обилието на бактериални и гъбни съобщества; таксономичен анализ чрез класически (клонови библиотеки) и метагеномни техники; оценка на функционалните потенциали (KEGG, Ecoplate, ензими); определяне на влиянието на тежките метали и абиотични фактори върху структурата и функцията на микробиома.

Целта и задачите са коректни, измерими, реализуеми и адекватни на научната специалност.

5. Методология и използвани методи

Реализацията на формулираните задачи на изследването е базирана на прилагане на съвременни стандарти и системни подходи за изследване. Това предполага използване на най-модерни методи за провеждане на изследването и оценка на получените резултати, използване на специализирана научна апаратура, приложение на специализирани методи на статистиката за верификация и тълкуване на получените резултати.

Методологията е един от най-силните елементи на дисертацията. Авторът Николова използва широк набор от съвременни техники. Богатият набор от методи и техники заслужава тяхното подробно изброяване. Методите и техниките включват:

Микробиологични и биохимични подходи:

- анализ на колония-формиращите единици (CFU)
- ензимни активности на шест ензима (ДХА, БГл, АлП, АсП, АрС, Ур)
- определяне на функционални профили чрез Biolog EcoPlate™

Молекулярно-генетични методи:

- PCR, qPCR
- TOPO TA клониране
- RFLP анализи
- създаване на клонови библиотеки на 16S рДНК
- таргетно ампликон секвениране (16S рРНК и ITS)

Секвениране и биоинформатика:

- секвениране чрез Illumina MiSeq
- филогенетични реконструкции
- OTU класификации
- функционални профили чрез KEGG Orthology

Статистически анализи:

- PCA, MDS, CCA
- PERMANOVA
- SIMPER
- корелационни модели.

За избраните цели и поставените задачи методите в това изследване са точно подбрани, адекватно проведени и статистически добре обосновани.

6. Структура и логическа последователност

Дисертацията е структурирана ясно и правилно, обособена на глави и раздели: Увод → Литературен обзор → Цел и задачи → Материали и методи → Резултати → Обсъждане → Изводи → Приноси → Приложение.

Изложението е последователно, стилът – научен, а графичният материал – ясен и информативен. Текстът е добре редактиран, с минимални езикови пропуски.

7. Основни научни резултати

Резултатите в дисертационния труд са представени логично и последователно, което дава възможност за тяхното пълно разбиране и подпомага критическото и задълбочено обсъждане. Сред най-значимите резултати са:

- В почвените проби, взети около „КЦМ 2000“ са открити високи нива на замърсяване с тежки метали. Тези нива са над максимално допустимите концентрации според Наредба №3/2008г. „за нормите за допустимо съдържание на вредни вещества в почвите“. Почвите са с високи нива на контаминиране с металите **Pb, Zn, Cd, Cu** и металоида **As**. Особен интерес представляват елементите **Pb, Zn** и **Cd**, тъй като те присъстват във високи концентрации, надхвърлящи максимално допустимите, във всички изследвани проби. Изчислен е индексът на замърсяване (NPI), което позволява категоризация на пробите по нивото на тяхното замърсяване. Установени са корелационни зависимости между тежките метали и между тяхната концентрация и разстоянието от източника на замърсяване („КЦМ 2000“). Определени са стойности на биологично достъпните форми на Pb, Zn и Cd в почвите.
- Чрез използването на два независими метода (CFU и qPCR) са установени съществени промени в обилието на микробните съобщества. Наблюдава се значително намаляване на бактериалното обилие в силно замърсените с ТМ (тежки метали) почви.
Интересно е, че при гъбните съобщества не се наблюдава зависимост от замърсяването на почвите с тежки метали.
- Реконструиран е таксономичният профил на бактериалните и гъбни съобщества чрез два независими генетично-молекулярни подхода: 16S рРНК клонови библиотеки и таргетно ампликон секвениране (16S и ITS). Чрез анализ на клоновите библиотеки е установено наличието на нови некултивируеми бактериални видове.
- Чрез горните методи е проведен задълбочен анализ на таксономичното разпределение по отдел, клас, род и вид на бактериалните съобщества. Чрез

подробен статистически анализ е показано, че бактериалното разнообразие е по-голямо в почвите, замърсени с ТМ.

- Значими корелации са установени между нивото на замърсяване с ТМ и гъбните класове Eurotiomycetes, Sordariomycetes, и Pezizomycetes.
- Разкрити са ключови бактериални таксони, свързани с устойчивост към тежки метали, като: *Actinobacteriota*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, а също и за гъбите от определени отдели като Ascomycota и Basidiomycota.
- Доказано е влиянието на тежките метали върху функционалните характеристики чрез:
 - ✓ асоцииране на по-високи ензимни активности със слабо замърсени почви, което подсказва, че замърсяването има инхибиращ ефект върху биологичната активност на почвените микробни сообщества;
 - ✓ намалени ензимни активности;
 - ✓ понижено функционално разнообразие;
 - ✓ значими промени в метаболитните профили.
- Предложени са прогнозни механизми за адаптация чрез KEGG анализи на потенциални гени за резистентност.

Всички резултати, изброени дотук, са достоверни и нови и привнасят научно значими данни за екологията на микробните сообщества при замърсяване с тежки метали и металоиди.

8. Научни и научно-приложни приноси

Постигнатите приносите на дисертационния труд са коректно формулирани. След критична оценка приносите могат да бъдат синтезирани като:

Научни приноси

1. За първи път в България е приложен метагеномен подход за изследване на микробиома в почви с дълготрайно замърсяване с тежки метали.
2. Охарактеризирана е структурата на бактериални и гъбни сообщества чрез комбиниране на клонови библиотеки и високопроизводително секвениране.
3. Разкрити са ключови бактериални таксони с потенциална роля в устойчивостта към замърсяване а почви с Pb, Zn и Cd.
4. Установени са статистически значими зависимости между абиотични фактори, тежки метали и микробното разнообразие.
5. Идентифицирани са потенциални адаптивни механизми, включително KEGG пътища, свързани с резистентността на бактериите към ТМ.

Научно-приложни приноси

1. Създадени са функционални профили на микробни съобщества, които могат да бъдат много полезни за биомониторинга.
2. Определен е потенциал за биоремедиация на почви чрез идентифицирани резистентни бактериални таксони.
3. Разработен е интегриран подход за определяне на микробни съобщества, който може да бъде успешно прилаган в бъдещи екологични оценки.

Получените данни могат да подпомогнат бъдещи експертни анализи и създаването на планове за управление на замърсени терени.

От тези приноси с изключителна важност се открояват откриването на таксони с устойчивост към замърсявания с някои тежки метали и създаването на функционални профили на микробни съобщества, които могат да бъдат полезни за биомониторинга.

Като цяло приносите са оригинални, обосновани и значими.

9. Публикации по темата на дисертацията

Най-добрата оценка за нивото на една научна разработка е броят и качеството на научните публикации по нея. По тази дисертация авторът Николова представя 3 научни публикации, в които е първи автор. Представени са също и участия в 9 научни форума, свързани с дисертационната тема. При подробно разглеждане на публикациите се вижда, че в тях е отразена най-важната и значима част от получените в този труд резултати. Затова може да се приеме, че най-важната част от резултатите са публикувани и достъпни за международната научна общност. Нещо повече, досега са забелязани общо 27 независими цитирания на публикациите в международната научна литература.

В допълнение, част от резултатите са докладвани и на международни научни срещи.

10. Критични бележки и препоръки

Всяка честна и независима научна рецензия следва да включва конструктивна критика. Най-важните ми забележки са:

1. В дискусията би могло да се акцентира върху сравнение с повече европейски метагеномни изследвания, за да се подчертае регионалната специфика на българските почви.
2. Някои фигури са представени в дисертационния труд с ниско разделително качество, което затруднява разчитането и интерпретацията на данните в тях.
3. Би било полезно в бъдещи изследвания да се включат:
 - анализи на подвижните фракции на всички тежки метали;
 - shotgun метагеномика за прецизно определяне на истински функционални гени;
 - определяне на влиянието на сезонните динамики върху обилието и разнообразието на микробните съобщества.

4. Системата Escorplate™ е информативна, но не обхваща цялото функционално разнообразие на микробиома. Разширяване към метаболомни подходи би добавило ценна информация за повлияването на микробните съобщества от замърсяването с тежки метали.

Тези критики и препоръки по същество са незначителни и не намаляват научната стойност на дисертацията.

11. Въпроси, свързани с дисертационния труд

Имам един въпрос към докторантката:

Може ли да се предположат онези характеристики на изследваните гъби, които, най-общо казано, ги правят по-резистентни от бактериите към замърсяванията с тежки метали?

12. Заключение

Дисертационният труд на Радина Николаева Николова представлява завършено, оригинално и научно значимо изследване, което:

- отговаря на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България;
- демонстрира отлична методологична подготовка;
- съдържа нови научни приноси;
- доказва способност на авторката за самостоятелна научноизследователска работа;
- авторефератът е изготвен съгласно изискванията на ЗРАСРБ и отразява напълно съдържанието на дисертационния труд. Авторефератът съдържа 69 страници. Освен кратко представяне на дисертацията, той включва научните приноси, както и списък на публикациите по дисертационния труд.

На основание представения труд, количеството и качеството на използваните методи, резултатите от изследванията и накрая неоспоримо постигнатите приноси на научния труд предлагам на Научното жури:

Да присъди образователната и научна степен „Доктор“ на Радина Николаева Николова.

30.11.2025 г.

Проф. Георги Милошев