

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д-р Петя Койчева Христова

Софийски Университет, Биологически факултет,
катедра „Обща и промишлена микробиология“

1. **Тема на дисертационния труд:** „Метагеномен и молекулярно-генетичен анализ на микробни съобщества около Българската полярна база на о-в Ливингстън “ за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“ в Професионално направление 4.3. Биологични науки (Генетика)

Автор на дисертационния труд: Веселин Валериев Дойчинов

Научен ръководител: доц. д-р Светослав Георгиев Димов

Със заповед на Ректора на СУ № РД 38-1394/12.03.2024 г. съм определена за член на научното жури за провеждане на процедура по защита на дисертационен труд на Веселин Валериев Дойчинов. Представените документи и материали отговарят на минималните изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ) и Правилника за неговото прилагане.

1. Кратки данни за докторанта

Докторант Веселин Валериев Дойчинов е магистър по Генно и клетъчно инженерство при Биологически факултет, на СУ „Св. Климент Охридски“. От 2021 е редовен докторант по професионално направление 4.3. Биологически науки, докторска програма „Генетика“ – Генно инженерство към катедра „Генетика“ в Софийски университет „Св. Климент Охридски“. От 15.02.2024 год. започва работа като асистент в катедра „Генетика“ на постоянен трудов договор.

2. Актуалност и значимост на дисертационната тема

Антарктика представлява уникална околна среда, както поради екстремните метеорологични и геоложки условия, така и поради относителната изолация от човешки влияния. Ниските средни годишни температури от -5°C до -50°C , редуващите се цикли

на замръзване и размразяване, ниската влажност на въздуха и липсата на органични хранителни вещества са основните ограничаващи фактори за живота в този регион. Минали представи описват Антарктика като стерилна екосистема с липсващо или минимално микробно разнообразие, но проучвания проведени още преди прилагането на метагеномните изследвания доказват обратното. Уникалната и сурова среда на Антарктика е селектирала множество култивируеми и некултивируеми микроорганизми с голям потенциал за полезни биологични дейности и производство на метаболити, като нови антибиотици, адаптирани към ниските температури ензими, пигменти и т.н. През последните години анализите на такива динамични микробни съобщества се осъществяват с молекулярно-генетични подходи, които позволяват бързо и задълбочено изследване на микробните общности и ускоряват идентифицирането на неизвестни видове. Развитието на секвенирането, обратната транскрипция и полимеразната верижна реакция създадоха възможности за използване на ДНК последователностите при установяване на филогенетична връзка между микроорганизмите. Първите подходи за категоризиране на антарктическите организми използват секвениране на 5S и 16S рРНК за идентифициране на прокариоти в скални и езерни проби, докато за идентифициране на гъби са секвенирани геномните последователности на 18S рРНК, ITS1 и ITS2. През последните години ампликон-базираното секвениране от следващо поколение (NGS) позволи бързо и задълбочено изследване на микробните общности и подобри възможностите за откриване на неизвестни видове. Въвеждането на този подход малко преди 2010 г. намира приложение не само за изучаване на антарктическите екосистеми, но и при повечето глобални изследвания на микробиологичното разнообразие в различни екологични ниши. Рутинното използване на този метод е катализирано от напредъка на масивни паралелни платформи за секвениране с висока производителност като Illumina (Solexa), Ion Torrent, Roche 454, SOLiD и други. Тези технологии позволиха бързото и рентабилно каталогизиране на големи и различни количества ДНК чрез едновременно секвениране на милиони къси фрагменти (~ 150–300 bp). По този начин метагеномиката, понякога наричана метабаркодиране на ДНК, стана подход за бърза анотация на микроорганизмите, присъстващи в проба от околната среда с доста възпроизводими резултати. Нещо повече, метагеномните изследвания, базирани на ампликони, имат предимството да са по-евтини, но достатъчно информативни. Прилагането на метагеномиката за изучаване на микробното биоразнообразие на различни екологични

ниши от Антарктика допринася за разширяване на нашето познание за този регион. Затова считам, че избраната тема е актуална и с голямо практическо значение.

Съдържанието на дисертационния труд напълно покрива обявената номенклатурна специалност по професионално направление 4.3 Биологични науки, научна специалност “Генетика” за присъждане на ОНС “доктор”.

3. Оценка на структурата на дисертационния труд

Дисертационният труд е написан на 144 стандартни страници – формат А4, резултатите са обобщени и представени в 16 таблици и 17 фигури. Структуриран е по класическата схема и е балансиран по отношение на обема на всеки раздел: Увод (2 стр.), Литературен обзор (46 стр.), Цел и задачи (2 стр.), Материали и методи (26 стр.), Резултати и обсъждане (39 стр.), Изводи (2 стр.), Приноси (1 стр.) и Литература (14 стр.). Много добро впечатление прави приложените списъци на използваните съкращения.

Дисертацията е написана с добър научен стил, с точно използване на терминологията което показва, че докторантът познава задълбочено тематиката. Необходимо е да се отбележи, че представената литературна справка предлага един сериозен анализ на състоянието на проблема. Докторантът се е запознал много добре с литературните данни и умело ги използва при интерпретиране на резултатите.

3.1. Литературен обзор

Литературният обзор е структуриран правилно с пряко отношение към целта на дисертацията и поставените задачи. Обзорът на дисертационния труд засяга два основни аспекти, които обаче са тясно свързани помежду си. В първата част докторантът представя основата, предимствата и недостатъците на метагеномните изследвания с фокус върху ампликон-базираното секвениране, основано на хиперпроменливите региони в гена на 16S рРНК. Във втората част е направен задълбочен преглед на микробното разнообразие на археи, бактерии и гъби в различни биотопи на Антарктика – почвени и скални, вътрешни езерни и ледникови води, морски, покривни и седиментни, криодупки, ледников лед и сняг, въздух. Третата тема разкрива влиянието на макрофлората и макрофауната върху микробните общности. В четвъртата тема се представя ендемичния характер на антарктическата микрофлора.

3.2.Цел и задачи

Целта на настоящата дисертация е да се направи задълбочен анализ на състава на микробните съобщества на археи, бактерии и гъби, присъстващи на антарктическият континент и околностите (морска Антарктика, суб-Антарктида, Южно море и др.), с помощта на ампликон базираното секвениране. Също така да се изолират нови микроорганизми, които в бъдеще да бъдат изследвани относно техния потенциал за приложение в различни биотехнологични процеси.

За постигането на формулираните цели докторантът си поставя 12 основни задачи, които включват: събиране на проби от различни местообитания и екологични ниши около Българската антарктическа база, изолиране на висококачествена ДНК за провеждане на метагеномен анализ, провеждане на ампликон-базирани метагеномни секвенирания и биоинформатичен анализ на данните за определяне на алфа и бета разнообразието. За постигане на втората цел са изолирани нови щамове микроорганизми, които са фенотипно и генотипно характеризирани и част от тях са секвенирани целогеномно за определяне до вид.

3.3. Материали и методи

Това е една важна част от дисертационния труд, която показва нивото на проведените научни изследвания. Представени са съвременни молекулни, биоинформатични и микробиологични методи, чието разработване и успешно прилагане е вече един безспорен успех и показва сериозната методична подготовка на докторанта. Методите са представени подробно и лесно могат да бъдат възпроизведени. Особено ясно и разбираемо са представени подходите за биоинформатична обработка на данните. Мултидисциплинарният характер на изследването е позволило придобиването на нови методически и практически умения.

3.4. Резултати, обсъждане и изводи

Основните резултати са представени съгласно поставените задачи и избраните методични подходи. Експерименталната част е изработена много прецизно и представена достоверно. Всички резултати са анализирани и съпоставени с литературните данни в самостоятелен раздел.

Изследването съвсем логично започва с оценка на качеството на секвениране на ампликон секвенираните варианти, която показва, че е постигната адекватна дълбочина на извадката както за бактерии, така и за гъби. Таксономичната анотация отразява разпределението на бактериалните и гъбните съобщества в изследваните проби и

идентифицира 1894 уникални бактериални таксона, като 1156 от тях са аотирани до вид. При гъбите са идентифицирани 244 таксона, като 173 от тях са определени до вид. Най-често характеризираната група в повечето проби са цианобактериите от семейство *Leptolyngbyaceae*. Други доминиращи групи в изследваните проби включват представители на *Bacteroidetes*, *Gamaproteobacteria*, *Alfaproteobacteria* и *Clostridiales*, а от гъбите – *Betamyces* и *Tetracladium*. Впечатление прави малкия брой прочити с праймерите за археи около 1% в повечето изследвани проби, като изключение правят пробите от морска вода (41% и 8% съответно). Най-голямо алфа разнообразие на бактериалната, гъбната и археалната общност е установено в проба S12 от почва около кореновата система на *Deschampsia antarctica* и най-малко в проба, изолирана от повърхността на скала. Повечето бактериални групи се групират заедно, което показва корелация между мястото на взимане на пробите и състава на бактериалните общности. Установените уникални профили се асоциират по-силно с факторите на средата, отколкото с макрофакторите на остров Ливингстън. Интересни резултати са получени при анализите на микробните профили на седименти от езерото Тодорина буза, които са напълно различни от профила на езерната вода. Високото бета различие между двете среди предполага известна стратификация (вертикално структуриране на различните слоеве) на езерото. Наличие на голямо алфа разнообразие, включващо значителен брой неизвестни видове, които не се групират с други микробни общности е установено в литотелмите (пукнатини в скалите с морска вода). Епилитната проба от повърхността на камък също съдържа уникална микробна общност, която не се групира с другите проби според бета разнообразието. При изследване на микробиологичния състав на проби от повърхността на потопени скали се установява специфична структура на биофилмите, където в горните слоеве доминират цианобактериите, които действат като автотрофни производители на микрообщността, докато различни хетеротрофни бактерии асимилират тези продукти в долните слоеве. Интересни резултати са получени при статистически анализ на различните индикатори в проучването, които предполагат наличие на антагонистични взаимодействия между археи, бактерии и гъби, вероятно причинени от суровите и в някои случаи олиготрофни антарктически условия. Създадените модели на антагонизъм се наблюдават в 56% от изследваните групи. Това предполага, че антагонистичните взаимодействия играят значителна роля в разпространението на представителите на трите домейна в Антарктика.

На база на получените резултати са формулирани 12 извода, които коректно отразяват съществената част от изследванията.

4. Приноси с научен и приложен характер

В извършените изследвания могат да се очертаят както теоретични, така и приложни приноси, които доказват значимостта на научната разработка.

Приемам формулираните от докторанта приноси на дисертационния труд. От съществено значение е факта, че това е първото задълбочено изследване на микробиомите в различни екологични ниши около българската антарктическа база „Св.Климент Охридски“, осъществено с метагеномен анализ. Важен принос за увеличаване на познанията ни за микробното разнообразие е изолирането на 11 нови вида бактерии, които не са описани до момента.

5. Участие на докторанта в изработването на дисертацията

Считам, че изпълнението на дисертационния труд е изцяло дело на докторанта.

6. Публикации във връзка с дисертационния труд

Докторантът е представил списък с две научни публикации (Q2, общ IF₂₀₂₂ = 5,6), свързани с дисертацията. Едната статия има вече 12 цитата, което е доказателство за научната стойност на дисертационния труд.

7. Автореферат

Авторефератът е изготвен, съобразно изискванията и вярно отразява резултатите от дисертацията като в съкратен вид са представени най-важните елементи от всички раздели (без литературния обзор).

8. Препоръки, забележки и въпроси

В дисертационния труд няма съществени грешки относно използваните подходи и представяне на резултатите, поради което нямам препоръки или забележки. Мога да отбележа някои технически грешки, които не намаляват стойността на работата.

Към докторанта имам следните въпроси:

- а) Какви са предимствата и ограниченията на операционните таксономични единици?
- б) Как може да се намалят или ограничат проблемите от групиране по непълно сходство?
- в) С какво се свързва алфа разнообразието на микробните съобщества и какво ни представят индексите на Шанън и Симпсън?
- г) Какво отчита бета разнообразието?

д) Какви допълнителни анализи могат да се направят за да се докажат по безпорен начин антагонистичните взаимодействия между отделните бактерии, гъби и археи?

9. Придобрита компетентност и съответствие с изискванията на образователната и научна степен „доктор”

В хода на изпълнението на експерименталната работа и оформянето на дисертационния труд Веселин Дойчинов е придобил компетенции и умения, които могат да бъдат групирани по следния начин:

- разширил е теоретичната си компетентност в генетиката;
- придобил е умения за работа с научна литература, анализирайки и обобщавайки научна информация;
- обогатил е методичните си умения, особено в частта на прилагането на метагеномния анализ и биоинформатични методи
- придобил е умения самостоятелно да оформя и дискутира резултатите, получени в хода на разработването на дисертацията, както и да прави изводи на базата на тях.

10. Заключение

Представеният дисертационен труд е едно завършено изследване, което предоставя ценна научна информация и разкрива възможности за практическо приложение. Много добрата теоретична подготовка е дала възможност на докторанта да подбере и съчетае набор от методи, които осигуряват изпълнение на поставените задачи и постигане на целта.

Въз основа на посочените аргументи оценявам положително предложението за рецензия дисертационен труд, който удовлетворява изискванията на ЗРАСРБ, Правилника за неговото приложение и Правилника на СУ и предлагам на Научното жури да присъди на Веселин Валериев Дойчинов образователната степен „Доктор“.

25.04.2024

Рецензент:

проф.д-р Петя Христова