

## **Рецензия**

**От: проф. Искра Витанова Иванова, дбн,**

Относно: оценка на дисертационен труд за придобиване на образователна и научна степен “доктор” в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление, 4.3 Биологически науки, Научна специалност Генетика  
Със заповед № ФС на Биологически факултет от 27.02.2024 г./Протокол №5 съм определена за член на научното жури.

Заглавие на дисертационния труд:

**„Метагеномен и молекулярно-генетичен анализ на микробни съобщества около Българската полярна база на о-в Ливингстън“**

Автор на дисертационния труд: **Веселин Дойчинов**

**Научен ръководител:**

**доц. д-р СВЕТОСЛАВ ДИМОВ**

### **1. АКТУАЛНОСТ И ЗНАЧИМОСТ НА РАЗРАБОТВАНЯ ПРОБЛЕМ**

Студената среда представлява по-голямата част от биосферата на Земята и е била успешно колонизирана от психрофилни микроорганизми, които са способни да виреят при ниски температури и да оцелеят и дори да поддържат метаболитна активност при минусови температури. Тези микроорганизми играят ключова екологична роля в техните местообитания и включват голямо разнообразие от представители и на трите домейна

(бактерии, археи, еукарии). Разработването на молекулярни техники сега позволява пълното идентифициране на отделните микроорганизми в сложните съобщества. Изследванията в световен мащаб са насочени към разработване на биоинформатични и молекулярни методи за анализ и геномно типизиране на различни микроорганизми. Това ми дава основание да оценя като актуална представената научна разработка. Последните важни открития от микробиологични изследвания на ледници включват: (а) изчислено значително микробно съдържание в полярен и неполярен лед, (б) откриване на жизнеспособни и разнообразни микробни популации в древен лед, (в) доказателства за микробна активност при температури под замръзване и г) корелации между микробния състав и климата на отлагането. Използването на напреднали технологии и интердисциплинарни подходи ще позволи анализите на геномните и клетъчните компоненти на отделните клетки и изследването на състава и функционирането на сложни микробни популации в тяхната естествена среда, подобрявайки разбирането ни за разнообразието и екологичната роля на микроорганизмите, обитаващи един от най-суровите среди на Земята. По дефиниция криосферата е частта от Земята, където водата е в твърда форма като сняг или лед. Включва огромни площи от морски лед, сладководен лед, ледници, ледени покривки, снежна покривка и вечна замръзналост. Поради изключително суровите климатични условия, тези замръзнали среди дълго време се смятаха за лишени от живот или служещи просто като хранилища за пренасяни от вятъра микроорганизми, хванати в капан. Въпреки това, нарастващият брой на последните проучвания върху микробната екология и разнообразието от проби от естествен лед изменят тези представи. Макар и все още ограничени, те показваха, че постоянно замразени среди съдържа изобилие от живи и разнообразни микроорганизми, които могат да бъдат открити и възстановени чрез отглеждане. В резултат на проучвания е изчислен общия брой клетки в ледените покривки на Антарктика които е да  $9,61 \times 10^{25}$ , което съответства до значителен въглероден резерв и представлява значителен резервоар на микробно разнообразие. В момента криосферата е важна не само като неразделна част от глобалната климатична система, но и като една от основните обитаеми екосистеми на биосферата на Земята и като най-добър аналог за търсене на извънземен живот.

## 2. ОБЕМ И СТРУКТУРА НА ДИСЕРТАЦИЯТА

Дисертацията е изложена на 231 стандартни страници текст. Спазена е общоприетата схема и препоръчителните съотношения между отделните части на труда, както следва:

- ✓ *Въведение* – 3стр.;
- ✓ *Литературен обзор* – 45 стр.;
- ✓ *Цел и задачи* – 2 стр.;
- ✓ *Материали и методи* – 25 стр.;
- ✓ *Резултати и обсъждане* – 37 стр.;
- ✓ *Изводи и заключение* -5 стр. и
- ✓ *Литература* – 14 стр.

Получените резултати са илюстрирани с 19 фигури и 16 таблици .

## 3. ЛИТЕРАТУРНА ОСВЕДОМЕНОСТ И ПОСТАНОВКА НА ЦЕЛТА И ЗАДАЧИТЕ

Представената настоящата дисертация е комплексна и предполага добро познаване на литературните източници и методите за решаването ѝ. Докторантът е направил обстоен преглед на постиженията на други изследователи, които е успял да предаде и анализира върху 45 страници в литературния обзор. Обзорът представя състоянието на проблема и доказва необходимостта от разработването на дисертационната теза. Литературният обзор се състои от 2 раздела, а именно основни предимства и недостатъци на метагеномните изследвания и преглед на бактериите, гъбите и археите идентифицирани чрез метагеномен анализ в Антарктика. Авторът предлага на вниманието преглед на бактериите, гъбите и археите идентифицирани чрез метагеномен анализ в Антарктика. В тази връзка са описани общите тенденции в разпространението и разнообразието на антарктическите микроорганизми. Литературният обзор включва няколко раздела посветени на почвени и скални микробни общности и влиянието на географията и общностите на микроорганизмите в антарктическите почви. Разглежда се влиянието между едафичните фактори и общности от микроорганизми в антарктически почви и ролята на различните групи микроорганизми в антарктически почви , както и литобионтни (скални) общности. Представена е информация за микробни общности в

езера с ледников произход, субледникови водни общности и морски общности. Обзорът предлага информация за съобществата в микробните покривки и седименти и микробни общности в криоконитни дупки, ледников лед и сняг. В обзора е отчетено и влиянието на макрофлората и макрофауната върху микробните общности. Би могло да се добави, че това ново възникващото поле на биогеографията демонстрира, че разпределението и изобилието на психрофилите може да доведе до появяването на някои доминиращи видове ендемични за тяхната среда. Полярните студени среди осигуряват идеални моделни системи с подобни екологични характеристики, разделени географски от климатични бариери.

Литературният обзор е конкретен, структуриран е правилно, следвайки логическата обвързаност на информацията. Данните от справката са послужили за ясното и правилно определяне не само на целта, но и за формулировката на задачите. Поставени са за решаване добре обосновани 14 експериментални задачи. Литературата (както в обзора, така и в целия труд) е тясно свързана с темата на дисертационния труд. Литературният списък включва внушителния брой от 253 заглавия на латиница. Те са основно от последните години. Това говори за отлична теоретична осведоменост на докторанта и с цел намиране на ново научно предизвикателство.

#### **4. ОЦЕНКА НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ МЕТОДИ И МАТЕРИАЛИ**

Разделът "Материали и методи" демонстрира внушителен набор от методи, съобразени с конкретните изисквания на експериментите. Те са съвременни и адекватни за реализацията на дисертационния труд. Описани са точно и подробно, като изцяло покриват многостранните области на работата: от класическите до модерните молекулярно-генетични изследвания. В процеса на изработката на дисертацията са били използвани следните групи от методи: 1) класически микробиологични техники за изолиране и получаване на чисти култури от микроорганизми, 2) методи за изолиране на ДНК от чисти култури, както и от композитни проби от околната среда с цел провеждане на ампликон-базирани метагеномни изследвания, 3) методи за класическо секвениране по Sanger и новогенерационно секвениране на платформата Illumina и 4) биоинформатични

методи в три основни направления – методи за оценка на качеството на данните от новогенерационното секвениране, методи за анализ на алфа- и бета-разнообразието при метагеномните изследвания и методи за асемблиране и анализ на бактериални геноми след проведено новогенерационно секвениране.

В отделните етапи на работата докторантът съчетава умело използваните подходи. Всички това ми позволява да дам висока оценка на научното ниво и на отличната подготовка на докторанта, която успява правилно да съчетае многообразие от класически със съвременни методи за целите на дисертацията, успешно решавайки поставените експериментални задачи.

## **5. ОЦЕНКА НА ПОЛУЧЕНИТЕ РЕЗУЛТАТИ**

Основната цел на настоящото изследване е определяне на състава на микробиотите в различни местообитания и екологични ниши около Българската антарктическа база „Св. Климент Охридски“ на о-в Ливингстън и изолиране и таксономично определяне на нови изолати микроорганизми от различни местообитания и екологични ниши около Българската антарктическа база „Св. Климент Охридски“ на о-в Ливингстън, които в бъдеще да бъдат изследвани за потенциал за приложение в различни биотехнологични процеси.

Раздел „*Резултати и обсъждане*“ е добре структуриран, подкрепен с табличен и графичен материал, с подходяща интерпретация на получени резултати от чужди научни колективи. Авторът последователно представя доказателствен материал по своята научна теза, като по този начин логически финализира експериментална работа. Извършена е голяма по обем и разнообразна експериментална работа в рамките на комплексно микробиологично и молекулярно-генетично проучване. Настоящото изследване е първото метагеномно проучване на проби е определяне на състава на микробиотите в различни местообитания и екологични ниши около Българската антарктическа база „Св. Климент Охридски“ на о-в Ливингстън. От получените резултати е видно, че Rarefaction кривите достигат плато при всички анализирани проби за трите групи организми в това проучване, което показва, че взетите проби са представителни за целите микробни съобщества. Наличието на уникални бактериални профили, по-силно асоциирани с факторите на микросредите, от които бяха взети пробите, а не толкова с макрофакторите на остров Ливингстън като цяло. В почвена

проба S12, взета от кореновата система на растение най-високото алфа разнообразие от всички сухи проби и всички изследвани групи и най-вероятно се дължи на ефекта, които ризосферата упражнява върху микробния профил там. За тази проба също е показано, че най-големият дял археи от сухите проби и най-големият дял идентифицирани гъби. Гъбните видове *Betamyces* и *Tetracladium* са идентифицирани в голям брой от пробите. *Betamyces* се развива в сладководни антарктически езера, които съдържат микропластмаси и може да бъде интерпретиран като индикатор за тях във водите на проучването. *Tetracladium* е показан да има биотехнологичен потенциал за синтезата на пектинолитични ензими. По-голямата част от гъбните последователности не са таксономично аотирани от класификатора дори до ниво тип. Това показва голямо изобилие от неизвестни гъбни видове, които предстоят тепърва да бъдат описани и представляват голям потенциал за бъдещи проучвания. Като цяло, малко на брой археални таксони преобладават във всички проби. Археите бяха най-слабо представената група от изследването и не са таксономично идентифицирани в някои от пробите, където по-голямата част от последователностите бяха аотирани като бактерии. Изключение са морските проби, където археите достигат значителна част от прочитите. По отношение на пробите от потопени скали се съдържат в голямо изобилие и богатство цианобактерии, много от които не са култивирани до момента. Най-често срещаният таксон е неизвестен вид цианобактерия от семейство *Leptolyngbyaceae*. Интерес представлява епилитната проба S17 от повърхността на камък в изследователската база на една уникална микробна общност, която не се групира с никоя друга проба според бета разнообразието. Микробният профил на седимента от езеро Тодорина Буза е изненадващо различен от профила на езерната вода. Това високо бета разнообразие между двете среди сочи за наличието на известна степен на стратификация в езерото. Профилът на микробната общност от повърхността на макроводорасло не се различа значително от този на повърхностните проби на потопени камъни. Разликите се свеждат до видове, които са типични индикатори за цъфтежа на водорасли. По отношение на литотелмите се установява уникален микробиологичен профил, който не се групира с никоя друга общност по бета разнообразие и е изключително богат по алфа разнообразие. Много от прочитите не могат да бъдат таксономично аотирани под нивото семейство, което сочи към наличието на голям брой неизвестни видове. Най-вероятно разпределението на

различни индикатори от проучването, както и статистически анализ на корелацията между тези индикатори, сочи към наличието на антагонистични взаимодействия между археите и другите два домейна от това проучване.

Това е първото генетично проучване на микроорганизмите около базата „Св. Климент Охридски“ и бе постигнато чрез метагеномни и геномни методи за идентифициране с помощта на платформата за секвениране на компанията Illumina. Малък брой метагеномни анализи се извършват в България и проучвания от този тип са критично важни за развитието на генетиката като научната област в страната. В допълнение бяха изолирани и някои нови изолати бактерии с помощта на набор селективни хранителни среди, таксономично определени доколкото е възможно, а техните геноми - секвенирани.

Въпреки това, получените резултати в това първо проучване пораждаат нови въпроси и идеи за по-нататъшни анализи.

Получените резултати представени в „*Резултати и обсъждане*“, логично следват хода на решаването на поставените задачи. Те са обобщени и дискутирани в светлината на публикуваните данни от последните години. Висока оценка заслужават както идеята, така и обемът от изследвания проведен по изпълнението на тази задача и в целия труд. Направената дискусия по всеки експеримент, съпоставката на резултатите за отделните щамове и експерименти, и съпоставката с литературните данни, още веднъж подчертава качествата на докторанта във владенето на експерименталната теория. С това той доказва, че е овладял напълно третата степен на обучението си и е завършен експериментатор. По-голямата част от изследванията представляват директен метагеномен анализ на микробните съобщества в полеви проби след изолиране на тотална ДНК. Ампликон-базираните метагеномни секвенирания са осъществени с праймери за еубактерии, гъби и археобактерии на платформата Illumina. Представените резултати се базират на биоинформационен анализ на голямото количество секвенционни данни в съответните екологични ниши. Обсъжда се таксономичното разнообразие и относителното изобилие на доминиращи и по-редки таксони, както и техните потенциални функционални характеристики с многобройни референции към сходни изследвания. Документиранията наблюдения и създадената база данни създават потенциал за по-нататъшни микробиологични и екологични изследвания на проучваните екологични ниши.

Интересен аспект на анализите е изследването на антагонистичните отношения между отделните домейни микроорганизми: бактерии, гъби и археи, основан на стойностите на броя общи тагове, броя на OTUs и индексите на Шанън, Симпсън, Chao1 и ACE. Получените относителните стойности се използват като индикатори за тълкуване на възможен антагонизъм. Тези резултати са представени в публикация на авторски колектив, включващ В. Дойчинов в списание Diversity 2024, 16,56.

## **6. ПРИНОСИ И ЗНАЧИМОСТ НА РАЗРАБОТКАТА ЗА НАУКАТА И ПРАКТИКАТА, ЗАБЕЛЕЖКИ И ВЪПРОСИ**

Приемам направените приноси.

Първо изследване на микробиомите в различни екологични ниши около Българската антарктическа база „Св. Климент Охридски“, осъществено с помощта на методи, които не се основават на култивиране. В условията на ограничена лабораторна инфраструктура при полеви условия е възможно да се изолира ДНК от различни източници, която е подходяща за ампликон-базирани метагеномни анализи. Изолирани са 11 чисти култури от 11 изолата, които принадлежат към неописани към момента нови видове бактерии. За пръв път на о-в Ливингстън бяха наблюдавани данни, сочещи към първична сукцесия на различни домейни микроорганизми в новообразувано езеро.

Дойчинов е автор в 2 научни публикации, като в една от тях е водещ изследовател, което показва творческата и изследователската активност при изработването и оформянето им. Интересът към тези разработки е и установеното цитиране (Scopus):

## **.ЗАКЛЮЧЕНИЕ**



Темата е актуална, докторантът е усвоил съвременни методи, експериментите са поставени методично правилно, получените резултати са достоверни и са солидна база за следващи научни и приложни разработки.

Предложената дисертация е доказателство, че Веселин Дойчинов е развил компетентности необходими за образователната степен доктор включващи теоретична подготовка, методологични познания, самостоятелност и опит за планиране на експерименти и способност за анализ на резултатите..

Въз основа на приведените аргументи за актуалност на проблематиката и оригиналните приноси, отразени в дисертационния труд давам своята висока оценка за неговата защита и препоръчвам на членовете на научното жури да присъдят на дисертанта Веселин Дойчинов образователната и научна степен „Доктор” по професионално направление “доктор” в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление, 4.3 Биологически науки, Научна специалност Генетика .

09.05.2024

подпис: