

Рецензия

на дисертационен труд на тема:

„Метагеномни проучвания върху детерминантите на антибиотична резистентност в моделни проби от околна среда“

за присъждане на образователна и научна степен „ДОКТОР“ в научно направление
4.3. „Биологически науки“

Докторант: *Деян Валентинов Дончев*, Национална Референтна Лаборатория
„Контрол и Мониториране на Антибиотичната Резистентност“ (НРЛ
„КМАР“) към Отдел „Микробиология“ на Национален център по заразни
и паразитни болести, с научен ръководител доц. *Иван Иванов*

Изготвил: *доц. Светослав Георгиев Димов*, ръководител Катедра „Генетика“,
Биологически факултет на Софийски университет „Св. Климент
Охридски“, назначен за член на научното жури със Заповед №
439/20.12.204 на Директора на НЦЗПБ

1. Професионално развитие на докторанта

Деян Дончев започва професионалната си кариера като завършва ОКС
„Бакалавър“ в Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски“ – спец.
„Молекулярна биология“. Той продължава образованието си в ОКС „Магистър“ в същия
факултет по спец. „Микробиология и Микробиологичен контрол“. От 2021 г. е редовен
докторант в Националния център по заразни и паразитни болести. Работил е като биолог
в Лаборатория по Микробиология и Вирусология към УМБАЛ „Лозенец“ и като биолог-
специалист по Лабораторна Микробиология в НРЛ „КМАР“ към НЦЗПБ, където работи
и към момента.

2. Научна актуалност на тематиката на дисертационния труд.

Представеният ми за оценка дисертационен труд е фокусиран върху
изключително сериозен в световен мащаб проблем, а именно изследване на наличието
в околната среда на генетични детерминанти, обуславящи резистентност към
антимикробни препарати. Причината се крие във факта, че микроорганизмите от една

страна притежават голям набор от механизми за хоризонтален генен пренос, включително и междувидов, а от друга тяхната висока мутабилност, повяляваща им огромна екологична пластичност, включително и под формата на придобиване на устойчивост към антимикробни препарати. Благодарение на това е възможно патогенни щамове бактерии, притежаващи генетични детерминанти, обуславящи устойчивост към АМП, да попаднат чрез канализацията и отпадните води в околната среда, където дори и да не могат да просъществуват за дълъг период от време, могат да ги прехвърлят на други бактерии. За изключителната сериозност на този проблем в световен мащаб говори и фактът, че преди няколко години генетични детерминанти за антибиотична резистентност към препарати, използвани изключително в хуманната медицина, но и не и селското стопанство и аквакултурите, бяха доказани във фекални проби на топлокръвни животни в Антарктика, която да момента се смяташе за предпазена от подобен вид замърсяване. Друг изключително тревожен факт е, че статистиката показва, че времето, необходимо да се появят първите устойчиви щамове микроорганизми към принципно нов различен клас антибиотици, по правило е доста по кратко в сравнение с времето, необходимо за неговото разработване и апробиране за употреба в хуманната медицина. Особено достойнство на дисертационния труд се явява и избраната методика – цялостно метагеномно новогенерационно секвениране, което позволява да се избегнат недостатъците на класическите култивационни микробиологични техники. Поради това мога уверено да заявя, че тематиката на дисертационния труд на Деян Дончев е изключително актуална в световен мащаб, а в България по нея досега не е работено, с изключение на едно ограничено пилотно изследване в околностите на Българската антарктическа база на о-в Ливингстън в Антарктика.

3. Обща структура на дисертационния труд.

Представеният ми дисертационен труд е развит в рамките на 202 страници с включена библиографска справка. Структуриран е по стандартен начин, като включва следните основни раздели: литературен обзор, материали и методи и резултати и обсъждане (представени заедно). Отделно са представени увод, цел и задачи, изводи, заключение, приноси и приложения.

3.1. Увод

Дисертационният труд започва с кратък увод в рамките на две страни и половина, в който се посочва конкретния и неизследван към момента научен проблем – замърсяването на околната среда с бактерии, притежаващи гени, обуславящи устойчивост към различни антибиотици, и свързаните с това рискове, и се обосновава необходимостта от осъществяването на проведените изследвания в рамките на дисертацията.

3.2. Литературен обзор

Литературният обзор е развит в рамките на 66 страници. Разделен е на два подраздела – първият разглежда същността на метагеномиката, докато вторият е фокусиран върху антимикробната резистентност. В съдържателен аспект в първата част на този раздел се прави преглед на същността и принципите, на които се основават метагеномните проучвания, включително и на методите за биоинформатичен анализ на получените данни. Тя започва с дефиниции на основни понятия като геномика, транскриптомика, протеомика и метаболомика, което се явява предпоставка за разглеждането в детайли на същността на метагеномиката, която пък от своя страна основен изследователски подход в настоящото изследване. Задълбочено са разгледани приложенията на метагеномните изследвания, както и двата основни подхода – ампликон-базираната метагеномика и цялостното метагеномно секвениране, като се посочват техните предимства и недостатъци. Обърнато е обстойно и внимание на биоинформатичната обработка на данните от новогенерационното метагеномно секвениране. Впечатлението ми е, че докторантът е с дълбоки познания и умения в областта на метагеномните изследвания.

Втората част на литературния обзор е с фокус върху устойчивостта на бактериите към антибиотици. Тази част започва отново с дефиниции на някои основни понятия, след което се прави много обстойен преглед на механизмите за придобиване и разпространение на гени, обуславящи устойчивост към антибиотици като мутации на клетъчни гени, трансформация, трансдукция и конюгация. Разглежда се статуса на AMP към момента и попадането и разпространението на гени, обуславящи AMP в околната среда по принцип и в частност във водни басейни. Накрая разделът логически завършва преглед на методите за изследване на AMP в околната среда – прави се преглед

култивационните методи, методите, основаващи се на полимеразна верижна реакция и тези, основаващи се на метагеномни изследвания (като се посочват принципите, предимствата и недостатъците).

Разделът съдържа три таблици и четири фигури с много добро графично качество, като коректно са посочени източниците, на основата на които те са направени. Като цяло от изложението на тази част на дисертационния труд мога да се убедя, че докторантът притежава широки научни познания по темата на дисертацията и е добре запознат с последните изследвания в световен мащаб в тази област. То също така говори, че той може много умело да интерпретира научна литература от различни източници.

3.3. Цел и задачи

За осъществяването на дисертационния труд е формулирана ясно една цел, а именно да се проучат разпространението и вида на детерминантите на антимикробна резистентност, подвижните генетични елементи и бактериалното биоразнообразие в проби от околна среда, както и потенциалния риск за здравето на човека. За нейното реализиране са поставени 8 експериментални задачи, които се явяват напълно достатъчни за постигането ѝ, и същевременно обхващат богат набор от експериментална работа и интерпретация на данни, чието овладяване е необходимо за придобиването на ОНС „Доктор“.

3.4. Материали и методи.

Разделът е развит в рамките на 19 страници. По ясен и възпроизводим начин са описани подробно методики за изолиране на тотална ДНК от различни водни източници с цел осъществяване на ампликон-базирани и цялостни метагеномни изследвания. Добро впечатление прави и използваният набор от използваните биоинформатични методи. Всичко това говори, че в процеса на изработката на дисертационния му труд, докторантът е придобил широк арсенал от практически умения, съответстващи за придобиването на ОНС „Доктор“. Добро впечатление прави фактът, че докторантът не се е изкушил да обсъжда и интерпретира своите резултати в

рамките на този раздел. Той е илюстриран с две фигури и девет таблици. По мое мнение избраният подход да се представят методологичните стъпки под формата на таблици се явява удачен от гледна точка на по-лесното им възприемане.

3.5. Резултати и обсъждане

Разделът е развит в рамките на 62 страници. В него в стегнат вид и с помощта на богат илюстративен материал (5 таблици и 24 фигури с добро графично качество) са представени получените от докторанта собствени експериментални резултати. Добро впечатление прави, че докторантът не се хвърля да представя експериментални данни от изследването на водните проби, а започва с „въвеждаща“ част, която има за цел да обоснове избора на методология за изследването. Тя започва с представянето и обсъждането на резултатите за изолиране на биомаса по създадения *in-house* протокол за флокулация в обезмаслено мляко и сравняването му с филтриране под вакуум, след което се пристъпва към сравнителен преглед на различни китове и протоколи за изолиране на ДНК, а в края на тази „въвеждаща“ част следват резултатите от приложените оптимизации за генериране на 16S секвенционни библиотеки.

Във втората част на раздела логически са представени резултатите от проведените метагеномни изследвания на водните проби от река Искър в района на селата Драгушиново и Мечката и от района на гр. Стара Загора – подпочвени води и двете пречиствателни станции, включени в проучването. В този подраздел са представени данните от осъществените метагеномни секвенирания, анализите на алфа-разнообразията, асемблирането на МАГ-овете и анализа за наличието на гени, обуславящи антимикробни устойчивости. По отношение на тази част от изследователската работа особено достойнство се явява не просто отчитането на тяхното наличие, но така също и анализа на техните генетични „обкръжения“ – плазмиди, ПГЕ и др. Това е особено важно, тъй като позволява изказване на хипотези относно механизмите на разпространение. От особено значение също така се явяват и получените данни, че ПСОВ не са ефективни по отношение на премахването на бактерии, притежаващи гени, обуславящи антимикробни устойчивости.

Цялостното ми впечатление от този раздел е, че докторантът притежава необходимите знания и умения да осъществи едно цялостно научно изследване, както и да и интерпретира коректно своите експериментални резултати, като ги анализира и

сравнява, където това е възможно, с други подобни научни изследвания. Това е необходима предпоставка за придобиването на ОНС „Доктор“. Към този раздел имам само отделни дребни технически забележки като отделяне на различни страници на легендите на някои от фигурите.

3.6. Изводи

Въз основа на извършената експериментална работа и получените от нея научно-теоретични и научно-приложни резултати са формулирани общо 7 извода. Добро впечатление прави фактът, че докторантът не се е изкушил да увеличи излишно броя на изводите, както и че не са налице приноси, формулирани като изводи.

3.7. Заключение

В рамките на 3 страници и половина са представени в стегнат вид обосновката за провеждането на настоящото изследване, получените при него резултати и направените най-важни изводи.

3.8. Приноси

Представени са общо 8 приноса, като от тях един е формулиран като фундаментален, 5 като научно-приложни и 2 като методични. Те са изцяло обосновани от получените експериментални резултати и поради тази причина ги приемам без съдържателни забележки. Добро впечатление прави и тук фактът, че не са представени изводи, формулирани като приноси. Единствената ми забележка е от технически характер, тъй като номерирането на изводите не е консистентно.

4. Автореферат.

Представен е автореферат в рамките на 78 страници. Съдържанието повтаря в съкратен вид самия дисертационен труд. Съдържат се основните раздели „Увод“, „Материали и методи“ и „Резултати и обсъждане“. Допълнително са

представени „Цел и задачи“, „Изводи“, „Заклучение“ и „Приноси“. Илюстративният материал включва 22 фигури и 13 таблици. По мое мнение обемът на реферата надвишава общоприетите норми, като напълно достатъчно би било методите само да бъдат изброени, но не и тяхното представяне в детайли. Като технически забележки мога да посоча грешното номериране на раздел „Цел и задачи“, както и отделянето на някои фигури на отделни страници от техните легенди. Не е представен автореферат на английски език, а вместо това в края на автореферата е представено кратко резюме на английски език в рамките на две страници.

5. Общи забележки върху проекта за дисертационния труд.

Като цяло представената за разглеждане работа прави добро впечатление на едно завършено цялостно научно изследване по актуален проблем, осъществено с едни от най-модерните методи в областта на молекулярната генетика. Общото впечатление, с което оставам, е че докторантът е един завършен и перспективен млад учен, който е способен да осъществи едно цялостно научно изследване по конкретна тема, да използва умело голям набор от лабораторни техники и методи, както и да интерпретира адекватно и обосновано получените от него експериментални и биоинформатични резултати.

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

При изпълнение на научноизследователската лабораторна, теоретична и биоинформатична работа, както и при оформяне на самия дисертационен труд, Деян Дончев е придобил компетентност, изразяваща се в знания в конкретната научна област, умения за поставяне и решаване на конкретни научно-изследователски задачи, умения за прилагане на модерни изследователски методи в конкретната област, както и такива за оценка на получените резултати. Те напълно отговарят за придобиването на ОНС „Доктор“.

7. Допустимост до разкриване на процедура защита

Съгласно представената ми информация Деян Дончев е съавтор на една научна публикация с квартил Q1 и една с квартил Q2. Съгласно Правилника за развитието на академичния състав в Република България за Професионално направление 4.3. „Биологически науки“ той събира необходимите 50 точки по показател 1 чрез написването на дисертационен труд. По група показатели „Г“ (показател 7) той събира 45 точки при необходим минимум от 30 точки, с което той покрива и дори надвишава изисквания от Закона минимум.

8. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

В съдържателен аспект представеният ми дисертационен труд представлява едно цялостно и адекватно по обем изследване, необходимо за придобиването на ОНС „Доктор“ в Професионално направление 4.3. „Биологически науки“. Деян Дончев е завършен млад изследовател, придобил значителни научни знания и умения, за което говори съавторството му в 18 научни публикации и h-индекс 3 в Scopus. Той също така събира необходимите точки съгласно Правилника за прилагане на ЗРАСРБ, поради което аз ще гласувам положително за придобиване на ОНС „Доктор“ в Професионално направление 4.3. „Биологически науки“, както и ще си позволя на колегите от Научното жури да направят същото.

София, 09 февруари 2025 г.

Svetoslav
Gueorguiev
доц. Светослав Димов

Digitally signed by
Svetoslav
Gueorguiev Dimov
Date: 2025.02.10
20:09:14 +02'00'