

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. дсн Невена Стоянова Богацевска Селскостопанска академия, Институт по почвознание, агротехнологии и защита на растенията „Н. Пушкиров”, София

на дисертационен труд, представен за защита за получаване на образователната и научна степен „доктор” по Професионално направление 4.3 Биологични науки, (Микробиология)

Автор на дисертационния труд: Здравка Веселинова Колева

Тема на дисертационния труд: „Микрофлора на храносмилателния тракт на охлюви от сем. *Helicidae*”

1. Актуалност и значимост на дисертационната тема

България е известна с изключителната си природа, подходяща за развитието на охлювите. Градинският охлюв е малка природна аптечка, богат източник на естествени вещества, алантоин, колаген, гликолова киселина, аминокиселини, минерални вещества, витамини – А, С и Е, коензими, протеинов комплекс, набор от антиоксиданти, естествени антибиотици и имуно-модулатори. Месото, богато на белтъчини, витамини, минерални вещества и бедно на мазнини, е кулинарен деликатес. Слuzта съдържа гликани, гликопротеини, ензими, протеини, антимикробни пептиди, а секретът регенерира тъканите. Тези компоненти се използват в производството на лекарствени и козметични продукти, които притежават *лечебно* действие при стафилококови и кожни инфекции, пневмонии, мастити, флебити, менингити, инфекции на пикочните пътища, хранителни отравяния, възстановяване и успокояване на кожата, зарастване на рани, белези, премахване на нежелана пигментация, стрии и целулит. Кафявият градински охлюв (*Cornu aspersum*) се отглежда в специализирани открити и закрити ферми и свободно живие в природата. Стопанското значение на охлювите и използването им като изключително здравословна храна изискват задълбочено познаване на състава и развитието на интестиналната микрофлора във всеки стадий от развитието им. Изучаването на микробното съобщество в храносмилателния тракт на *C. aspersum*, метаболитната роля и взаимоотношение с гостоприемника и избор на подходяща храна е

задължително условие за създаване на санитарни норми при култивираното им отглеждане.

Изложените факти много добре мотивират правилния избор на темата, нейната актуалност и практическа значимост.

2. Оценка на структурата на дисертационния труд

Дисертационният труд е написан на 199 стандартни страници – формат А4, резултатите са обобщени и представени в 22 таблици и 36 фигури. Структуриран е по класическата схема и е балансиран по отношение на обема на всеки раздел. Приятно впечатление прави естетическото оформяне на работата с оригинални цветни фигури и снимки. Докторантката допълнително включва в дисертацията: списък на таблиците, фигурите, използваните съкращения и дискусия, което придава напълно завършен и оформен вид на първия самостоятелен научен труд.

Дисертацията е написана на правилен български език с добър научен стил. и точно използване на терминологията, за което имат и голяма заслуга научните ръководители.

2.1. Литературен обзор

При избора на темата, формиране на целите и задачите Колева е подпомогната от много добрата литературна осведоменост. Цитирани са общо 316 автори, от които *един* на кирилица и 315 на латиница. Подробното изучаване на научните достижения, отразени в литературните източници, позволяват на докторантката да постави началото на нови за страната изследвания върху динамиката и видовото разнообразие на бактериалното съобщество в интестиналния тракт на кафявия градински охлюв (*C. aspersum*), както и да обсъди и приложи полифазния подход за диференцирането на изолиранте бактерии на базата на разработените разнообразни фенотипни и молекулярни методи и практики.

Докторантката познава задълбочено научните публикации по проблема, правилно ги анализира, обсъжда и използва, за да защити своите виждания и научни дирения, както и да интерпретира получените резултати.

2.2. Цел и задачи

Целта на дисертацията и поставените конкретни задачи са формулирани ясно и точно: изучаване на динамиката и характеристика на видовия състав на бактериалните популации в чревния тракт в зависимост от жизнения цикъл на кафявия градински охлюв.

2.3. Материали и методи

Разделът “Материали и методи” е представен систематизирано, точно е детерминирана целта на извежданите експерименти. Използван е богат набор от методи: *фенотипни* (морфологична и биохимична характеристика чрез-Полимикротест-20Е, АРІ-тестове; антибактериална активност); *молекулярни* (ARDRA анализ; PCR амплификация: на ITS фрагментите на 16S-23S р ДНК и на 16S рДНК; амплификация с родово специфични праймери; с праймери tRNA-ala-23S/10; Мултиплекс и видово специфичен PCR; RFLP анализ на фрагменти от интергенните участъци и на 16S рДНК; секвениране; метагеномен анализ). Рестрационните профили са обработени със софтуерна програма VWR GenoSoft. Идентифицираните секвенции са използвани за построяване на филогенетични дървета за всеки отделен етап от жизнения цикъл на кафявия градински охлюв. В разработения от докторантката дисертационен труд, експерименталният материал е обработен с умение, точност и прецизност с разнообразни, молекулярни методи и софтуерни програми.

Задълбоченото изучаване на специализираната литература и прецизното изпълнение на методичния план гарантират на Колева получаването на убедителни резултати.

2.4. Резултати и обсъждане

Данните са правилно обработени, систематизирани и интерпретирани.

Измененията в бактериалното съобщество в интестиналния тракт в различни етапи от жизнения цикъл на *C. aspersum* са доказани с помощта на ARDRA анализ. Установени са разлики между тотална и култивируема ДНК на чревната микробиота през отделните фази на развитие (новоизлюпени, активен период, аестивация и хибернация). Естествените популации на бактериите се

променят по състав и структура под влияние на сезонната ритмика. Този анализ се използва за първи път за изучаване на микробното разнообразие на интестиналната микрофлора при кафявия градински охлюв. Установено е, че ентеробактериите, млечнокиселите и амилотичните бактерии естествено се развиват и размножават в отделните етапи от жизнения цикъл, най-висока е числеността им в активния период. Физиологичното състояние на охлювите се отразява върху количествения и качествен състав на микрофлората в храносмилателния им тракт.

Чревната микрофлора на *C. aspersum* се състои от Грам положителни, разпределени в шест морфологични типа и Грам отрицателни бактерии, които формират 15 групи по морфологични признаци. Доказано е, че Грам отрицателните изолати са ферментиращи и се отнасят към сем. Enterobacteriaceae.

Разработена е схема за точна идентификация и диференциация на Грам отрицателните бактерии в интестиналната микрофлора на охлювите, която включва PCR амплификация на 16S-23S ITS рДНК, рестрикционен анализ на ITS-23S рДНК и 16S рДНК, видово специфичен и мултиплекс PCR и секвенционен анализ. Идентифицираните бактерии се отнасят към сем. Enterobacteriaceae (род *Citrobacter*, *Kluyvera*, *Buttiauxella*, *Klebsiella*, *Erwinia*, *Enterobacter* и *Raoultella*), сем. Aeromonadaceae (род *Aeromonas*) Тези видове доминират в клоновите библиотеки през отделните етапи на жизнения цикъл на *C. aspersum*.

В разнообразните, разнородни и сложни бактериални популации, които обитават гастроинтестиналната система на кафявия градински охлюв са идентифицирани чрез полифазен подход за първи път се съобщават Грам отрицателните видове: *Buttiauxella agrestis*, *Acinetobacter oleivorans*, *Kluyvera cryocrescens*, *Kluyvera ascorbata*, *Raoultella planticola*, *Pectobacterium carotovorum*, *P. chrysanthemi*, *Enterobacter kobei* и *Lelliottia amnigena*

Pectobacterium carotovorum, *P. chrysanthemi* и *Lelliottia amnigena* са известни фитопатогени, причинители на синдрома « мокро гниене » по растения от различни ботанически семейства.

Идентифицираните Грам положителни бактерии са два типа Firmicutes Actinobacteria. За първи път като компоненти на интестиналната микрофлора на *C. aspersum* се съобщават млечнокиселите бактерии от род *Lactobacillus* (*L. brevis*, *L. graminis*, *L. curvatus*, *L. plantarum*, род *Leuconostoc* (*Ln. subsp. mesenteroides*, *Ln. gelidum*) род *Vagococcus* (*V. penali*), род *Weissella* (*W. confusa*) и род *Rhodococcus* (*R. erythropolis*).

Разлика в качествения състав на микрофлората в различните етапи на

жизнения цикъл на охлювите се доказва чрез метагеномния анализ. Само при новоизлюпените охлюви се развиват и размножават видове от клас β -*Proteobacteria*, клас *Actinobacteria* (сем. *Nocardiaceae*) и клас *Bacteroidetes* (сем. *Flavobacteriaceae*). Активно хранещите се охлюви се обитават от бактерии принадлежащи към клас *Fusobacteria* (сем. *Fusobacteriaceae*, род *Cetobacterium*).

Метагеномният анализ се прилага за първи път за изучаване на биологичното разнообразие на микробното съобщество в интестиналния тракт на *C. aspersum*.

Анализът на получените от докторантката резултати отговорят на поставената цел и задачи.

2.5. Изводи и приноси

Данните са правилно обработени, систематизирани и обосновани в оригинални научни и научно - приложни приноси, лично дело на докторанта.

Приемам направените изводи и приноси, които логично произтичат от получените резултати.

3.Участие на докторанта в изработването на дисертацията

Не познавам докторанта Здравка Колева но считам, че дисертационният труд е нейно лично дело прецизно направлявана от научните ѝ ръководители проф. д-р П. Мончева и доц. д-р П. Христова.

4. Препоръки, забележки и въпроси

При задълбочения прочит на дисертационния труд възникват някои въпроси, които бих препоръчала на докторантката да обсъди и анализира методично опитите, получените данни, направените изводи и заключения. Този задълбочен разбор ще и послужи при разработването на нови тези и хипотези в бъдещата и научна работа.

Считам, че дискуссионната част на дисертацията има вид на обобщение или заключение. В раздел резултати и обсъждане много точно и ясно се прави научна дискусия, интерпретират се получените резултати на фона на известното в световната литература, но липсват изводи. Ако всеки раздел завършва с изводи, по-ясно и разбираемо ще се приемат многобройните анализи използвани при

идентификацията на изолираните бактерии.

Имам следните въпроси към докторантката:

1. Сравними ли са резултатите, получени при анализите на охлювите, отглеждани във ферми и на същия вид в природата?
2. Какви са условията на отглеждане, и с какво са хранени охлювите в специализираната ферма, за да се направи заключение за видовия състав на бактериите и присъствието на фитопатогени?
3. Каква е ролята на изолираните и идентифицирани видове бактерии в храносмилателния процес на кафявия градински охлюв - позитивна или негативна?
4. Кой от използваните молекулярни методи дават най – точни резултати за детерминиране на чревната бактериална микрофлора?
5. Какви са перспективите за продължаване на изследванията в тази насока?

Считам, че някои неясноти и излишни пространни разсъждения, са нормални при написване, оформяне и защитаване на собствените резултати, изводи и приноси на първия самостоятелен труд на всеки докторант.

5. Публикации във връзка с дисертационния труд

Резултатите от настоящия дисертационен труд са отразени в три колективни научни статии, една публикувана в списание с импакт фактор: *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 2014г (IF - 0,379), друга в списание „Хранително-вкусова промишленост” и една под печат в *J. BioScience Biotechnology* издание на (ПУ”П. Хилендарски”). Всички публикации съдържат обобщени, анализирани данни от проведените експерименти в дисертацията. Докторантът участва с постери в три научни конференции.

6. Автореферат

Авторефератът отговаря на изискванията и отразява цялостно методите на изследване, получените резултати, изводи и научни приноси. Добре е структуриран и илюстриран с фигури и таблици.

7. Придобита компетентност и съответствие с изискванията на образователната и научна степен „доктор”

В хода на изпълнението на експерименталната работа и оформянето на дисертационния труд докторантката Здравка Колева разширява своята теоретична компетентност, изгражда умения за работа със специализирана литература, да анализира и обобщава научната информация, да използва разностранни методи и техники, самостоятелно да оформя, дискутира и обобщава резултатите в изводи и заключения.

8. Заключение

Дисертационният труд представен от Здравка Веселинова Колева отговаря на изискванията на ЗРАСРБ, Правилника за неговото приложение и Правилника на СУ „Св. Кл. Охридски“.

Направените изводи и приноси ми дават основание убедително да гласувам положително и да препоръчам на научното жури, сформирано със Заповед на Ректора на СУ „Св. Кл. Охридски“ да присъди научната и образователна степен „доктор“ по професионално направление 4.3. Биологични науки (Микробиология) на Здравка Веселинова Колева.

5.03.2015
София

Подпис:
(проф. д-р Н. Богацевска)