

**14. СПРАВКА ЗА ОРИГИНАЛНИТЕ НАУЧНИ ПРИНОСИ, КЪМ КОИТО СЕ ПРИЛАГАТ
СЪОТВЕТНИТЕ ДОКАЗАТЕЛСТВА**

СПРАВКА

за приносите в научните трудове
на доцент д-р Петя Койчева Христова
представени за участие в конкурса за академична длъжност „професор“
по професионално направление 4.3. Биологически науки
(Обща и хранителна микробиология)

Представените за рецензиране научни трудове са в научната област на конкурса за заемане на академичната длъжност „професор“ по Обща и хранителна микробиология и могат да бъдат систематизирани най-общо в следните направления: *биологични опасности в храните, антибиотична резистентност на опортюнистични патогени, молекулна таксономия на микроорганизмите, получаване на биологично активни вещества с антимикробно действие и микробиологичен контрол на пробиотични продукти.*

Една част от научноизследователските разработки в периода преди хабилитацията ми за доцент имат сходна научна насоченост, но представените за участие в настоящия конкурс 22 научни труда разширяват и надграждат изследванията в областта на молекулярните анализи на микроорганизмите. В тях са развити и валидирани нови диагностични алгоритми за таксономична оценка на структурата и динамиката на микробните съобщества в храните, изследвани са важни въпроси относно безопасността и качеството на храните и ролята на микроорганизмите в този процес. Авторската справка очертава основните научни, научно-приложни и методични приноси на кандидата.

ПРИНОСИ НА НАУЧНИТЕ ТРУДОВЕ

ПО ПОКАЗАТЕЛ В 4.3. ХАБИЛИТАЦИОНЕН ТРУД – МОНОГРАФИЯ

В хабилитационната справка по Показател В 4.3. е представена монография (№ 44), разглеждаща една особено актуална тема на нашето време свързана с изясняване на ролята на кръстосаните патогени като новите биологични опасности в растителните храни.

Способността на човешките патогени да персистират в растенията, да запазват своята вирулентност към човека и да предизвикват растителни заболявания, както и на растителните патогени да причинят болести по човека доказва, че в природата вече са се утвърдили нов тип

взаимоотношения - тези на кръстосаните инфекции между представители на различни биологични царства. Микроорганизмите, участници в този тип взаимоотношения, са интересни системи за изследване на еволюцията на патогенността, както и за изясняване на ползите при експлоатацията на множество гостоприемници с биологично различна структурна организация и физиология. За първи път, в настоящата монография се разглежда парадигмата на кръстосаната патогенност в две биологични царства, където растенията и хората са общи „домакини“ и се търси отговор дали има бариери в това проникване и как се осъществява преминаването от едно царство в друго.

Основните приноси на монографията са свързани със задълбочения анализ на публикуваните до момента данни относно молекулните механизми за осъществяване на кръстосаната патогенност, установяването на специфични генни профили и микробни структури на кръстосаните патогени, свързани с колонизацията на растенията. В това **първо** по рода си научно изследване се доказва съществуването на общ план за протичане на инфекциозния процес и на общ имунен отговор в кръстосаните царства. **Фундаментален теоретичен принос** в работата е изясняване на предпоставките за възникване на нови кръстосани патогени и създаване на еволюционни модели, които биха обяснили появата на новите взаимоотношения.

В монографията, растенията се утвърждават не само като истински алтернативни гостоприемници на кръстосаните патогени, но и като необходим вектор за повторна колонизация на хора и животни. Това поставя нови предизвикателства за свеждане до минимум на болестите пренасяни с пресните растителни храни. Проблемите, свързани с непълна оценка за безопасността на храните от наличие на кръстосани патогени са потвърдени със собствени изследвания. Представената информация е важна основа за подобряване на съществуващите стандарти при производството на растителните храни. Безопасността на растителни храни е комплекс от много фактори, в който най-важни са познаването на сложните взаимодействия между кръстосаните патогени, растението-гостоприемник и околната среда. Към това се прибавят и проблеми, специфични за всеки сорт плодове и листни зеленчуци, местоположението и прилаганите производствени практики. Показана е необходимостта да се разработи и приложи нов системен подход, който разпознава не само целия жизнен цикъл на биологичната система патоген-растение, но и пълния процес на заболяването. В монографията са формулирани някои приоритетни изследвания, които увеличават **практическите приноси** на разработката. Това *първо въведение* в мултидисциплинарната арена на кръстосаните патогени върху растенията увеличавана екологичната осведоменост на нашето общество. Изучаването на кръстосаните патогени е нова

мултидисциплинарна област, изучаваща същността и процесите на връзка и взаимодействие в системата „човек – растение“, с цел управление на биологичното разнообразие и здравето на човека. Затова в монографията се разглеждат интердисциплинарни изследвания и в заключението се предлага създаване на обща координационна мрежа, обединяваща различни специалисти по безопасността на храните. Предлага се да се развият изследователски стратегии и да се разработи механизъм за изработване на мултидисциплинарни предложения, насочени към разрешаване на фундаментални и приложни въпроси, за създаване на нови стратегии за минимизиране на риска от микробно замърсяване в храните.

ПРИНОСИ НА НАУЧНИТЕ ТРУДОВЕ
ПО ПОКАЗАТЕЛ Г.7. НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ В ИЗДАНИЯ, КОИТО СА РЕФЕРИРАНИ И
ИНДЕКСИРАНИ В СВЕТОВНО ИЗВЕСТНИ БАЗИ ДАННИ

1. Антибиотична резистентност на опортюнистични патогени

Високата плътност на микробните популации и бързо променящите се условия превръщат ризосферата в уникално местообитание на земните екосистеми, в което се селекционират опортюнистични патогени, които са силно конкурентоспособни за хранителни вещества и произвеждат много антимицробни метаболити. Тези патогени обаче с лекота преминават в хранителните вериги и като носители на висока антибиотична резистентност създават сериозни здравни проблеми. Някои основни обитатели на ризосферния микробиом (*Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp.) като компонент на микробиотата на най-често консумираните пресни растителни храни (44) са преминали границите на своите растителни гостоприемници и все по-често се изолират като причинители на вътрешболнични или обществено придобити инфекции при човека. Проблемът с резистентността придобива още по-голямо значение заедно с появата на бактерии, продуциращи ензими, разграждащи антибиотиците.

В последните години продуцентите на бета-лактамази с разширен спектър на действие (ESBL), карбапенемази (KPC) и метало-бета-лактамази (MBL) сред видове от сем. *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *Klebsiella* sp.) и видовете от родовете *Pseudomonas* и *Acinetobacter* нарастват експоненциално (50, 52, 54). Инфекциите, причинени от такива бактерии са особено

застрашителни, тъй като гените на резистентност се намират в преносими плазмиди и един осъществен хоризонтален трансфер може да направи неефективен цял клас антибиотици. Не толкова тревожна е тенденцията за по-висока честота на резистентност към множество лекарства сред бактериите, произвеждащи ензимите MBL и ESBL.

Основните оригинални научни и приложни приноси на тези изследвания са свързани:

- с установяване на най-ефективните бързи тестове за откриване продуценти на широко спектърни бета-лактамази, карбапенемази и метало-беталактамази, тъй като бързото и точно идентифициране на бактериите, произвеждащи тези ензими е от съществено значение за избора на подходящо антибиотично лечение.
- с доказване, че използването на хромогенен агар няма предимство при откриване на продукцията на ESBL ензими и съществуват разлики в чувствителността на фенотипните тестове за откриване на продуценти на MBL. Фенотипните тестове, Rosco MBL тест за потвърждение (комбинация от IMP + DPA) идентифицират най-близко до RT-PCR метода положителните MBL изолати от *Pseudomonas spp.* и *A. baumannii*. Тъй като използването на един метод може да бъде недостатъчно за получаване на добри резултати е необходимо използването на повече от един метод.
- в оценка на степента на резистентност към други антибиотици на карбапенем-резистентни и ESBL-продуциращи опортюнистични бактерии. Установено е, че щамовете, продуциращи ESBL показват най-ниската степен на резистентност към карбапенемите. Карбапенем-резистентните щамове имат висока степен на устойчивост към ампицилин-сулбактам (95,5%), ципрофлоксацин (87,8%) и цефепим (83,3%). Много рядко (0.9%) карбапенем-резистентните щамове са продуценти на метало-беталактамази.

2. Молекулна идентификация и типирание на микроорганизмите в храните

Значителна част от научните изследвания на кандидата са насочени към създаване и валидиране на *общ диагностичен алгоритъм*, приложим за бърза и точна идентификация на микроорганизмите в динамични микробни съобщества. Храните представляват подходяща матрица за валидиране на тези изследвания.

2.1. Полифазно-таксономична характеристика на смесени биоценози

Биоразнообразието в смесените биоценози като ръжени теста (49), интестестиналният тракт

на *Cornu aspersum* (48, 60), на пчели *Apis mellifera* (61) и пробиотични хранителни добавки (57) успешно е характеризирано с помощта на полифазно-таксономичен подход, който комбинира различни фенотипни и генотипни методи.

Основните културално-независими ДНК методи за идентификация на бактериите и за установяване на техните филогенетични връзки са базирани предимно на секвенционния полиморфизъм на 16S рДНК. Този подход е успешно приложен за разграничаване на еволюционно отдалечени видове, но е трудно приложен за голям брой изолати или смесени микробни съобщества. Затова, комбинирането на PCR амплификация на гена 16S рДНК с рестрикционен анализ дава добър инструмент за разграничаване на микробните биоценози. Такъв подход (ARDRA) е разработен и приложен за изучаване на динамиката на интестиналната микробиота на ядливи охлюви от вида *Cornu aspersum* в зависимост от различните етапи в техния жизнен цикъл (60). Сухоземните охлюви се разглеждат като функционална храна, която може да се прилага при различни заболявания. Тяхната интестинална микрофлора е важен фактор, който определя физиологичното здраве на охлювите и налага нейното задълбочено познаване. **Основен оригинален принос** на това изследване е, че за **първи път** в научната литература са доказани динамичните промени в структурата на чревната бактериална общност на *C. aspersum* в зависимост от климатичните сезони и техния жизнен цикъл. Важен **практико - приложен принос** от изследването е валидирането на комплексен подход от културално-независими молекулни методи (ARDRA с ендонуклеази *Hinf*I и *Csp*BI), клъстерен анализ и фенотипни културални методи, който потвърди, че състава на чревната микрофлора е функция на физиологична активност на охлювите.

С намаляване на еволюционното разстояние между видовете секвенционния полиморфизъм на 16S рДНК обаче е неприложен за диференциране на филогенетично близки микроорганизми. Затова в предходни наши изследвания са избрани други таргетни участъци, които да послужат като обща матрица за идентификация на бактериите (9, 12, 13). В еубактериите, рибозомалните гени са обединени в оперон, където трите последователни гена (16S-23S-5S) са разделени от два интергенни участъка (ITS). Интергенните участъци (ITS), разположените между гените 16S и 23S рДНК, се характеризират с по-висока генетична вариабилност. Това превръща тези участъци в изключително подходящи при разработване на нови стратегии за идентификация на микроорганизмите. Полиморфизмът в дължината и последователността на 16S-23S участъците се дължи на присъствието на една или няколко функционални единици, такива като гени кодиращи тРНК. Научните изследвания свързани с изучаване организацията на рибозомалните оперони на

някои млечнокисели бактерии имат **фундаментален и приложен принос**.

Въз основа на структура на рибозомалните оперони и секвенционния полиморфизъм на 16S-23S рибозомални интергенни участъци (ITS) е създаден ефективен диагностичен алгоритъм за бърза типирание на бактериите в храни. Първоначално разработената молекулна схема за молекулно типирание на млечнокисели бактерии (9, 12, 13, 17) е доразвита и допълнена в настоящите изследвания с включване на нови етапи на молекулни анализи като мултиплекс PCR, PCR с видово специфични праймери и секвениране (48, 49, 57).

Разработеният комбиниран подход е валидиран при оценка на смесени биоценози и има **практико-приложен принос в методично отношение** за оценка на биоразнообразието и динамиката на млечнокиселите бактерии в ръжени теста (49), в интестиналния тракт на *Cornu aspersum* (48) и на *Apis mellifera* (61).

Оригинален принос с науко-теоретичен и приложен характер е изолирането и идентифицирането за **първи път** от ръжена закваска в България на видовете *Lactobacillus spicheri*, *Lactobacillus paralimentarius*, *Lactobacillus kimchii* и *Lactobacillus sanfranciscensis* (49), както и проследяване на динамиката на развитие на млечнокиселата популация в процеса на ферментация.

Млечнокиселите бактерии са важна част от микробната популация в храносмилателния тракт на много животни и играят важна роля за поддържане на екологичното равновесие между различните видове микроорганизми, обитаващи тези среди. Тази микробиота участва в храносмилателния процес (ферментация) и енергийното снабдяване (L-лактат, ацетат). Изолирането и характеризирането на млечнокиселата компонента от интестиналния тракт на охлюви в различни физиологични етапи от техния жизнен цикъл представлява **първото** по рода си изследване за тази група организми (48). Затова, **основен принос** е доказване присъствието на млечнокиселата компонента в чревния тракт на *C. aspersum*, отглеждан в български ферми. Важен **практико-приложен принос** на това изследване е прилагането на комбиниран подход за установяването на биоразнообразието на млечнокиселата микробиота и на факторите, които го определят. Посредством PCR амплификация на 16S-23S ITS участъци изолатите от млечнокиселата микрофлора са типирани до род. Диференцираните щамове от родовете *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* и *Weissella* са определени до вид чрез PCR с видово специфични праймери, мултиплекс или секвениране на участък от 16S гена. **Теоретико-приложен принос** е установяване на състава на млечнокиселата компонента на българските охлюви, която включва видовете *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus*

plantarum, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus graminis* и *Lactobacillus curvatus*. Видовете *L. brevis*, *L. graminis* и *L. curvatus* са открити при охлюви във фаза на хибернация, докато *L. plantarum* е идентифициран както в активна, така и във фази на хибернация.

Подобен молекулен подход е приложен за изучаване на състава и функционалната активност на млечнокиселата микрофлора на чревния тракт на пчелите *Apis mellifera*. **Основен принос** на изследването е установяване, че представители на видовете *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, *L. iwatensis*, *L. kunkeei* и *Weissella confusa* са основни компоненти на чревната микробиота на българските пчели (61).

2.2. Молекулна идентификация и типирание на фитопатогенни бактерии

Едно от най-сериозните заболявания по *Solanum lycopersicum* L. (домати) и *Capsicum annuum* L. (пипер), което води до сериозни икономически загуби е заболяването бактериално струпяване. Някои фитопатолози отнасят част от причинителите на това заболяване към групата на опортюнистичните патогени, което ги поставя в групата на потенциалните кръстосани биологични опасности. Затова, ранната видова идентификация на патогените е необходима за контрол и профилактика на заболяването.

Към днешна дата четири близкородствени вида от род *Xanthomonas* са определени като причинители на това заболяване. За тяхната първоначална идентификация са използвани фенотипни методи, които обаче не позволяват пълно таксономично диференциране. Единствено прилагането на молекулни методи позволи определяне на тяхната видова принадлежност.

Разработването на бърз молекулен анализ за амплификацията с видово специфични праймери е съществен *практически принос*, тъй като успешно се идентифицират трите вида фитопатогени: *Xanthomonas vesicatoria*, *Xanthomonas euvesicatoria* и *Xanthomonas gardneri* (47). Валидирането на специфичните праймери върху повече от 136 щамове *Xanthomonas* прибави други *важни приноси в изучаване на разпространението* на тези фитопатогени в земеделските култури. Така е доказано, че в изследванията от 2015 година, доминиращият вид за България е *Xanthomonas vesicatoria*, който инфектира само *Solanum lycopersicum* L., докато *Xanthomonas gardneri* инфектира в по-слаба степен *Solanum lycopersicum* L. и *X. euvesicatoria* поражават основно *Capsicum annuum* L.

В следващи наши изследвания е създаден и приложен нов диагностичен алгоритъм за бърза идентификация на фитопатогени с цел проследяване пътищата на тяхното проникване както в България, така и в Македония. Молекулният алгоритъм на амплификация на 16S-23S ITS rDNA

PCR с последващ RFLP-анализ за идентифициране и диференциране на причинителите на бактериално струпяване е валидиран върху 262 български и македонски щама (51). Важен *практически принос* е създаването на генетични (рестрикционни) карти на видовете *Xanthomonas euvesicatoria* (132 щама), *Xanthomonas vesicatoria* (115 щама) и *Xanthomonas gardneri* (15 щама), които спомагат за бърза идентификация на причинителите и детектиране на пътищата на проникване.

За дискриминативно молекулно типирание на генотипа на фитопатогенните видове *Xanthomonas* е приложен метода на пулсовата електрофорезата (PFGE), който често се използва за епидемиологични изследвания и анализ на огнища, причинени от различни патогени. Важен *фундаментален и приложен принос* на това изследване е проследяване на генетичното разнообразие на колекция от 100 щама, изолирани през периода 1985–2012 г. от различни сортове *Solanum lycopersicum* L. и плевели от 11 географски региона в България. За нашата страна са открити два хаплотипа за *Xanthomonas vesicatoria* и един хаплотип за щамове *Xanthomonas gardneri* (55).

До 2015 г. от земеделските полета с *Solanum lycopersicum* (домати) в България са изолирани само видовете *X. vesicatoria* и *X. gardneri*. В последното наше проучване за **първи път** докладваме изолирането на *X. euvesicatoria* като патоген, причинител на бактериално струпяване по домати в България (58). Видовата принадлежност на 27 щама, изолирани от различни региони, е определена чрез специфична за вида PCR амплификация и системата BIOLOG. Важен *практически принос* е определянето на структурата на фитопатогена в зависимост от представените патотипове и раси. Новите изолатите на *X. euvesicatoria* са представени от два патотипа - домати (Т) и доминиращ (63%) пипер-домати (РТ). Сред Т щамовете са определени три раси, докато сред РТ щамове са идентифицирани в пет раси (58).

3. Микробиологичен контрол на пробиотични продукти

Пробиотиците имат редица полезни ефекти върху здравето на хората, тъй като играят важна роля в защитата срещу вредни микроорганизми, намаляват метаболитните нарушения и поддържат имунните функции. Оценката на всеки продукт като пробиотичен изисква точна видова идентификация на включените млечнокисели бактерии и изпълнение на критериите за безопасност, функционалност и технологична приложимост. Липсата на специфично и строго регулиране на процеса на регистрация на пробиотиците, обаче често е свързано с намаляване на

качеството на тези хранителните добавки. За да се оценят микробиологичните и функционални качества на различни пробиотични добавки, предложени на българския пазар, е разработена и предложена процедура за контрол на качеството на пробиотичните хранителни добавки (57, 59).

Приносите на това изследване произтичат от оценката на качеството на пробиотичните продукти. Оказва се, че почти нито един от тестваните пробиотични продукти от българския пазар няма задоволително качество. Установени са сериозни отклонения от информацията, предоставена на етикетите за щамовия състав на продуктите. Един от най-често срещаните проблеми е по-малкият брой жизнеспособни млечнокисели бактерии в продуктите, както и откриването на нежелана странична микрофлора. Голяма част видовете, описаните в спецификацията, не се изолират. Повечето щамове, използвани в тестваните пробиотични добавки, имат лоши функционални свойства, които не отговарят на критериите за продуктите, които трябва да се считат за пробиотични. Използването на пробиотични бактерии в хранителните добавки трябва да бъде придружено от нови знания за това как тези бактерии могат да бъдат повлияни от различни фактори, присъщи на технологичните процеси, физикохимичната среда на храната и стомашно-чревния транзит. Препоръчва се да се изиска доказателство за *in vivo* функционалността на добавките като процедура, която позволява да се комерсиализират „доказани“ пробиотични продукти, а не потенциални. Стратегията за молекулярна идентификация, предложена в това проучване, демонстрира бърз, полезен и мощен инструмент за идентифициране на хранителни добавки на млечнокисели бактерии на видово ниво. Въз основа на получените резултати може да се заключи, че всички пробиотични продукти, налични на българския пазар, трябва да бъдат подложени на рутинна и щателна проверка от съответните органи (57, 59).

4. Получаване на биологично активни вещества с антиминокробно действие

Нарастващата устойчивост на патогенни бактерии спрямо действието на антибиотици е предизвикателство, което налага търсенето на нови антибактериални вещества. Морските обитатели са отлични източници на антиминокробни протеини и се считат за обещаващи кандидати за лечение на микробни инфекции (53). Проучването на антиминокробния спектър на хемоцианин от *Eriphia verrucosa* показва, че нативния хемоцианин (EvH) няма биологична активност за разлика от неговите пет структурни гликозилирани единици (SU), които показват диференцирана антибактериална активност. С **фундаментално и приложено значение** са резултатите, че фракцията с най-високо съдържание на гликани има потенциал да бъде приложена като заместител

на някои често използвани антибиотици. **Важен научен принос** са получените доказателства, че степента на гликозилиране на хемоцианина играе важна роля за проявление на неговите функционални антибактериални свойства.

ПРИНОСИ ПО ПОКАЗАТЕЛ Е.19

ПУБЛИКУВАН УНИВЕРСИТЕТСКИ УЧЕБНИК ИЛИ УЧЕБНИК, КОЙТО СЕ ИЗПОЛЗВА В УЧИЛИЩНАТА МРЕЖА

Принос към академичното образование е представянето на два учебника за студенти от всички биологически специалности.

Учебникът по **Микробиология** (в съавторство с проф. С. Влахов) е напълно преработено издание на учебника по микробиология, издаден през 2006 г. Съвременното развитието на молекулярната микробиология наложи създаването на един качествено нов учебник. **Основен принос на** кандидата е написването на раздела „Анатомията на прокариотната клетка“ и изясняване на механизмите за биосинтеза на редица клетъчни структури в микробните клетки. Този учебник е предназначен както за студентите от всички специалности на СУ „Св.Климент Охридски“, така и за студенти от другите природни университети в страната, където се изучава дисциплината микробиология. Някои глави могат да представляват интерес и за специалисти микробиолози, биохимици, генетици, биофизици, агроинженери, почвоведи, создатели на компютърни програми и др.

Учебникът по **Патогенни микроорганизми** за първи път разглежда ролята на микроорганизмите в инфекциозния процес в единство със защитните отговори на техните гостоприемници. Представени са механизмите на действие на основните групи токсини, както и факторите на патогенност и вирулентност на избрани, най-често разпространени човешки патогени. Учебникът е предназначен за студенти от биологическите специалности, които имат интереси към изучаване на патогенния потенциал на микроорганизмите.

Подпис:

Petya
Hristova



Digitally signed by Petya Hristova DN:
c=BG, o= Sofia, i=Sofia, ou=Sofia
University, ou=University Computing
Centre, cn=Petya

Hristova,
e=petya.hristova@biofac.us-
sofia.bg
Date: 2020.11.30 18:29:24 +02'00'

доц. Петя Христова