

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 –Бактериална генетика и молекулно клониране

на тема **:ГЕНОМНО ТИПИЗИРАНЕ НА ПРОБИОТИЧНА МИКРОФЛОРА
ИЗОЛИРАНА ОТ НАТУРАЛНИ ПРОДУКТИ**

Автор на дисертационния труд: **АНИТА БОЖИДАРОВА ГЮРОВА**

Научни ръководители:

доц. д-р СВЕТОСЛАВ ДИМОВ

АКАД. Д-Р ДРАГА ТОНЧЕВА, ДБН

1. АКТУАЛНОСТ И ЗНАЧИМОСТ НА РАЗРАБОТВАНЯ ПРОБЛЕМ

Микробиотата е един от решаващите фактори, които благоприятстват човешкия метаболизъм и здравословното му състояние и са обект на многобройни изследвания през последните години. Разработването на молекулярни техники сега позволява пълното идентифициране на отделните микроорганизми в сложните съобщества. Изолирането и таксономично характеризиране на млечнокисели бактерии, както от традиционни за България, естествено ферментирали продукти, така и от пчелни продукти, добити в различни екологични региони на страната е от особен интерес. Приложението на млечнокиселите бактерии при разработването на нови пробиотични и функционални

храни непрекъснато се увеличава. Изследванията в световен мащаб са насочени към разработване на биоинформатични и молекулярни методи за анализ и геномно типизиране на различни микроорганизми. От друга страна част от тези геноми са получени от млечнокисели бактерии, използвани като пробиотици или стартерни култури при хранителни ферментации. Изучаването на българското зеленото сирене вероятно притежава бизключително богат микробиом, както и единствената българска благородна плесен. Анализът на млечнокисели бактерии, част от микробиома на естествено ферментирани и пчелни продукти, притежават благоприятен ефект върху човешкото здраве и здравето на пчелите, оказват предпазващо въздействие срещу патогенни микроорганизми. Всичко изброено ми дава основание да оценя като актуална представената научна разработка, с потенциал за научни постижения, които да имат бърза практическа реализация.

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* – 64 стр.;
- ✓ *Цел и задачи* – 2 стр.;
- ✓ *Материали и методи* – 36 стр.;
- ✓ *Резултати и обсъждане* – 64 стр.;
- ✓ *Изводи* -2 стр. и
- ✓ *Литература* – 18 стр.

Получените резултати са илюстрирани с 32 фигури и 17 таблици .

3. ЛИТЕРАТУРНА ОСВЕДОМЕНОСТ И ПОСТАНОВКА НА ЦЕЛТА И ЗАДАЧИТЕ

Настоящата дисертация е комплексна и предполага добро познаване на литературните източници и методите за решаването ѝ. Докторантката е направила обстоен преглед на постиженията на други изследователи, които е успяла да предаде и анализира върху 64 страници в литературния обзор. Обзорът представя детайлно

състоянието на проблема и доказва необходимостта от разработването на дисертационната теза. Литературният обзор се състои от няколко раздела. Авторката последователно разглежда и предлага обширно описание на основните характеристики на основни родове млечно кисели бактерии (тип Firmicutes, Actinobacteria.) Разгледани са аспекти на участието на млечно киселите бактерии при ферментация на храни, при ферментацията на млечни продукти и месни продукти, при ферментацията на зеленчуци и кисело зеле и при ферментацията на закваска за хляб. Продуцирането на анти-микробни метаболити (бактериоцини и пептиди) са представени обширно. Представени са данни за терапевтичния ефект на млечнокиселите бактерии, като пробиотици. Особено полезна е информацията за молекулярно-генетични методи за изследване на млечнокисели бактерии, включващо стандартни методи за определяне на родова принадлежност, определяне на видова принадлежност посредством секвениране на гените за 16S РНК Мултилокусно секвенционно типизиране (MLST анализ) и ново генерационно секвениране (Next-Generation Sequencing).

На вниманието на читателя се предлагат и някои нерешени проблеми. 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 17 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 452.заглавия на латиница. Те са основно от последните години. Това говори за отлична теоретична осведоменост на докторантката 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 отделните етапи на работата докторантката съчетава умело използваните подходи. Всички това ми позволява да дам висока оценка на научното ниво и на отличната подготовка на докторантката, 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 молекулярно-генетичното и геномното характеризирание на шамове микроорганизми, изолирани от функционални храни и пчелни продукти, както и изследване на микробиотата на функционалните храни и пчелните продукти с помощта на методи, основаващи се на новогенерационно секвениране.

Раздел „*Резултати и обсъждане*“ е добре структуриран, подкрепен с табличен и графичен материал, с подходяща интерпретация на получени резултати от чужди научни колективи. Авторката 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-биохимично изследване.

Настоящото изследване е първото метагеномно проучване на традиционното българско зелено сирене, произведено в с. Черни Вит. Този уникален млечен продукт е единственото българско сирене с благородна плесен. В резултат от проведените експерименти е установено, че зеленото сирене притежава богат микробиом, съдържащ предимно микроорганизми, които не са стартерни култури по своята природа и които от своя страна допринасят за неговите отличителни характеристики, включително обонятелни и органолептични. В това проучване, имащо за цел характеризирането на българското зелено сирене, като първа стъпка е метагеномно изследване, основано на секвениране от следващо поколение. Проучването обхваща региони V3-V4 от 16S РНК гена при бактериални видове и ITS2 при гъби. Авторката установява, че Firmicutes заемат първото място с повече от 50% присъствие, следвани от Actinobacteria с малко повече от 40% и на трето място са Proteobacteria с около 6%. Останалите бактериални типове са представени в незначителни количества. В рамките на типа Firmicutes на родово и видово ниво на първо място, с повече от 30%, се нареждат грам-положителните млечнокисели

бактерии (МКБ) от родове *Streptococcus*, *Lactobacillus* и *Lactococcus*. Те са следвани от представители на рода *Staphylococcus* (около 18%). Видовете от р. *Lactococcus* са третата основна МКБ група с 3,7% и три вида. По-слабо представените родове МКБ са *Leuconostoc*, *Weissella*, *Marinilactibacillus* и *Enterococcus*. Грам-отрицателни бактерии са в незначителни количества и сред тях най-представените родове са *Veillonella* и *Selenomonas*. Докато различните видове *Lactobacillus*, *Leuconostoc* и *Enterococcus*, както и *Lactococcus lactis* и *Streptococcus salivarius* подв. *thermophilus* имат основна роля за узряването на сиренето и тяхното присъствие е очаквано, присъствието на някои видове *Staphylococcus*, като наличието на *Lactococcus garvieae* предизвиква известни опасения. Третият бактериален тип, който беше значително представен, беше Proteobacteria с две семейства - *Halomonadaceae* и *Moraxellaceae*. *Chryseobacterium* е единственият представител на род Bacteroides, който се нарежда сред 35-те рода. Почти всички (99,99%) от откритите видове гъби принадлежат на Ascomycota, представени почти еднакво от три класа: *Eurotiomyces*, *Sacharomycetes* и *Sordariomycetes*. Сред тях, първият клас е представен от един род и един вид - *Penicillium roqueforti*, който е и най-застъпеният гъбичен вид. *Sordariomycetes* е вторият по присъствие клас на Ascomycota, представен почти изцяло от *Scopulariopsis flava*, както и от минимални количества *Fusarium oxysporum* и *Trichothecium roseum*. Сред класа *Sacharomycetes* най-голямо присъствие е отчетено на *Debaryomyces hansenii*, последван в намаляващ ред от *Pichia membranifaciens*, *Candida zeylanoides*, *Kluuyveromyces lactis* и *Torulasporea delbrueckii*. Съставът на микрофлората на зелено сирене, макар и да показва обща структура, варира при различните изследвани проби, което може да бъде обяснено с факта, че ферментацията на сиренето зависи почти изцяло от микроорганизми, постъпващи от околната среда, както и от типа на използваното мляко (овче или козе). Богатият микробиом на българското зелено сирене беше допълнително характеризирани чрез изследването на неговото алфа разнообразие. Индексите на Шанън и Симпсън са използвани за оценка на разнообразието въз основа на наблюдаваните ОТЕ, като първият дава по-голяма тежест върху видовото богатство, а вторият върху видовата равномерност. Кривите на разреждане и видово разнообразие от бактериални и гъбични видове на партидите зелено сирене бяха изчислени въз основа на анализите на алфа разнообразието. Съдържащата се в тях информация позволява изготвяне на първична оценка на микробиома. В това проучване,

всички партии показват доста сходни криви за видовете бактерии и гъби. С цел проучване и сравняване на съставните съобщества от пробите в четирите партии сирене, са анализирани индексите на бета-разнообразието с помощта на софтуера QIIME, използвайки разстоянията UniFrac. По същият начин, конструираниите UPGMA дървета за претеглените UniFrac и за непретеглените UniFrac разстояния при бактерии и гъби не предоставят убедителна информация за свързаността между микробиома на четирите анализирани партии сирене. Четирите партии сирене се произвеждат от различни видове мляко (овче и козе) и в различни периоди от годината, което означава, че различните климатичните условия също се отразяват на екологичния микробиом. Присъствието на потенциални патогенни микроорганизми, типично за всички ферментирали млечни продукти от сурово мляко, е твърде незначително и най-вероятно не представлява риск за консумация - както поради изключително ниския брой ОТЕ, така и поради това, че са потиснати и не-жизнеспособни, както е описано за други известни сирена. Въпреки това, получените резултати в това първо проучване пораждаат нови въпроси и идеи за по-нататъшни анализи - най-важният от които е геномната характеристика на преобладаващите видове. Евентуалното секвениране на целите микробиоми би позволило по-прецизна количествена характеристика на микробиомните съобщества.

Колекция от 45 щамове получени, в резултат на изолиране от пчелни семейства от 15 кошера от пчелини, разположени в гр. София, гр. Видин, с. Душанци и с. Момчиловци са отнесени към *E. Durans*. Молекулярно-генетичните изследвания доказват, че един и същи щам присъства в четири от шестте кошера, определен като *E. durans* и наименован EDD2. Чрез провеждане на ПВР с праймери, таргетиращи гени за антибиотична резистентност е установено, че при изследваният щам липсват генетични детерминанти за устойчивост към ванкомицин *vanA*, *vanB*, *vanC1* и *vanC2*. Аналогична проверка за фактори на вирулентност не е установила наличието на гени, кодиращи хиалуронидаза, желатиназа и колаген-свързващ белтък. Устойчивостта на щам EDD2 срещу антибиотици е изследвана и фенотипно. Отчетените резултати демонстрират, че щам EDD2 проявява чувствителност към следните антибиотици: ампицилин, гентамицин, ципрофлоксацин, левофлоксацин, ванкомицин, тейкопланин, линезолид и тигециклин - като категорично показват липсата на детерминанти за резистентност в щам EDD2.

За изследване на бактериоцини продуциран от *Enterococcus durans* EDD2 е използван се подход, базиран на биоинформатичен анализ на геномната му последователност. С този анализ са идентифицирани два предполагаеми клъстера сходни на enterocin L50A/L50B и enterocin P. Фокусът на изследването е идентифицирането на бактериоцин-продуциращи ентерококови щамове, притежаващи потенциал да инхибират растежа на причинителя на заболяването американски гнилец, както и щамове притежаващи пробиотичен потенциал. Тринадесетте изолата демонстрират инхибиторна активност срещу *Paenibacillus larvae*.

От събраната колекция изолати на род *Enterococcus* е проведено изследване за наличие на протеолитична и бактериоцинова активност, в резултат на който 90 бр. от изолатите показват бактериоцинова активност и протеолитична активност. След секвениране на гените за 16S РНК изолатите принадлежат на: *Lactiplantibacillus plantarum*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Levilactobacillus brevis*, *Rosenbergia*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Serratia*, *Staphylococcus equorum* и *Staphylococcus saprophyticus*. От направените изследвания става ясно, че ампликон-базираното метагеномно секвениране на проби, съдържащи комплексни микробиоти, съчетано с биоинформатичен анализ на онлайн-базирани платформи се явява удобен, ценово оправдан, надежден и бърз начин за детайлен анализ и характеризирание на ферментирани функционални храни и някои други природни продукти, притежаващи собствени микробиоми.

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 докторантката във владенето на експерименталната теория. С това тя доказва, че е овладяла напълно третата степен на обучението си и е завършен експериментатор.

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

Приемам направените приноси.

За особено значими считам, че за първи път в България бе извършен ампликон-базиран метагеномен анализ на ферментирал млечен хранителен продукт – зелено сирене.

За първи път в България са секвенирани геноми на пробиотични за пчелите щамове от р. *Enterococcus*.

Гюрова е автор в 5 научни публикации, като в две 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):

- ✓ **Gyurova, A.** Vladimirova, A., Peykov, S., Dimitrov, M., Strateva T.& Dimov, S.G. (2021) Characterization of *Enterococcus durans* EDD2, a strain from beehives with inhibitory activity against *Paenibacillus larvae*, Journal of Apicultural Research, doi: [10.1080/00218839.2021.1936915](https://doi.org/10.1080/00218839.2021.1936915);
- ✓ Dimov, S.G., **Gyurova, A.**, Zagorchev, L., Dimitrov, T., Georgieva-Miteva, D., Peykov, S. NGS-Based Metagenomic Study of Four Traditional Bulgarian Green Cheeses from Tcherni Vit, LWT, Vol. 152, (2021), 112278, ISSN 0023-6438, doi: [10.1016/j.lwt.2021.112278](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112278);
- ✓ Dimov, S.G., **Gyurova, A.**, Vladimirova, A., Dimitrov M., Peykov S., Strateva T., WGS-based characterization of the potentially beneficial *Enterococcus faecium* EFD from a beehive. *Mol Biol Rep* 47, 6445–6449 (2020). doi: [10.1007/s11033-020-05663-5](https://doi.org/10.1007/s11033-020-05663-5);
- ✓ Peykov S., Vladimirova A., **Gyurova A.**, Dimitrov M., Strateva T., Dimov, S., Draft genome sequences of *Enterococcus durans* EDD2 strain associated with honeybees, *AIMS Agriculture and food*, [Volume 5, Issue 2](https://doi.org/10.3934/agrfood.2020.2.288): 288-291 (2020). doi: [10.3934/agrfood.2020.2.288](https://doi.org/10.3934/agrfood.2020.2.288);
- ✓ Dimov S. G., S. Peykov, A. Vladimirova, M. Balinska, **A. Gyurova**, M. Dimitrov, T. Strateva, Molecular genetic study of potentially bacteriocinogenic and non-virulent *Enterococcus* spp. isolates from beehives in Bulgaria, *Genetics and Plant Physiology*, 8(3–4): 129–137, (2018).

- Дисертантката се е съобразила с всички направени забележки на проведената предзащита.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Темата е актуална, докторантката е усвоила съвременни методи, експериментите са поставени методично правилно, получените резултати са достоверни и са солидна база за следващи научни и приложни разработки. Открояват се изключително оригинални научни и приложни приноси. Въз основа на гореизложеното уверено мога да заявя, че рецензията на дисертационен труд представлява оригинална научна разработка, с теоретично и приложно значение.

Предложената дисертация е доказателство, че Анита Гюрова е развила 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 събраните кредити е изпълнена успешно предвидената образователна научна програма.

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 дисертантката Анита Гюрова образователната и научна степен „Доктор” по професионално направление 4.3. Биологически науки, специалност Генетика –Бактериална генетика и молекулно клониране.

30.03.2023г.

Подпис:

