

## ***РЕЦЕНЗИЯ***

**от доц. д-р Деница Руменова Теофанова,**

СУ „Св. Климент Охридски”, Биологически факултет, Катедра Биохимия,  
член на Научното жури, назначено със Заповед № РД-38-107 от 28.02.2023г. на Ректора  
на СУ „Св. Климент Охридски”, проф. дфн Анастас Герджиков за присъждане на  
Образователната и Научна Степен „Доктор” по

Област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика,

Професионално направление: 4.3. Биологически науки

Докторска програма: Генетика – Бактериална генетика и молекулно клониране

**ОТНОСНО:**

**Дисертационен труд на тема:** „Геномно типизиране на пробиотична микрофлора  
изолирана от натурални продукти“

**Автор на дисертационния труд:** Анита Божидарова Гюрова, задочен (след  
трансформация от редовен) докторант към Катедра „Генетика“ на Биологически  
факултет, СУ „Св. Кл. Охридски“

**Научни ръководители:** Доц. д-р Светослав Димов

Акад. дбн Драга Гончева

### **1. Общо представяне на процедурата и докторанта**

#### **1.1. Документи**

Представените от Анита Божидарова Гюрова материали включват следните необходими документи според Закона за развитие на академичния състав в Република България и Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в СУ „Св. Климент Охридски“: 1) Дисертационен труд; 2) Автореферат на български и английски език; 3) Научни публикации в пълен текст – общо и такива свързани с дисертацията; 4) Автобиография; 5) Копие на диплома за образователно-квалификационна степен Магистър и приложението към нея; 6) Удостоверение за положени изпити от индивидуалния план; 7) Протокол и становище за проверка на оригиналността и отсъствие на плагиатство в дисертационния труд; 8) Заповед за зачисляване и трансформация на докторантура, и за отчисляване с право на защита; 9) Доклади от докторанта и научния му ръководител за разкриване на процедура за вътрешна защита; 10) Заповед за назначаване на научно жури и 11) Справка за съответствие с минималните национални изисквания за ОНС „Доктор“ с приложение, съдържащо поименен списък на публикациите.

Дисертацията съответства на критериите при придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в СУ за професионално направление 4.3. Биологически науки.

#### **1.2. Представяне на докторанта**

Анита Гюрова придобива ОКС „Магистър“ по специалност „Индустриален мениджмънт и маркетинг“ и допълнителна специализация „Банки и финансов бизнес“ в Технически университет, София, а в последствие и допълнителна магистърска степен по „Бизнес администрация“ в Университет за национално и световно стопанство, София, в периода 1995-2007г. През 2018г. придобива и ОКС „Магистър“ по „Генетика и геномика“ в Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски“. В периода 2018-2022г. е редовен (в последствие трансформиран в задочен) докторант към Катедра „Генетика“ на Биологически факултет при СУ. До този момент, професионалния ѝ трудов опит не е в сферата на биологичните науки, но от 2018г до момента е придобила допълнителни компетенции благодарение на редица курсове и уъркшопи. Всичко това показва научен интерес, съчетан с надграждане на знания, опит и умения. Приложената автобиография

е допълнена и с публикационната активност и участията на докторанта в научни проекти и научни форуми, което говори за повишаване на квалификацията и израстване както на научно, така и на личностно ниво.

### **1.3. Плагиатство**

На базата на приложенията от проверката за плагиатство става ясно, че откритите проценти на сходство по трите критерия не засягат получените оригинални резултати и не са следствие от неправомерно заимстване и преписване на чужд текст. Отчетените по различните параметри, проценти са под регламентирания праг.

## **2. Характеристика на дисертационния труд**

### **2.1. Актуалност и значимост на дисертационната тема**

Актуалността на тематиката на представения ми дисертационен труд е безспорна и се обуславя от редица фактори.

От една страна стои икономическото и екологично значение на поддържането на здравето на пчелните кошери и обвързаните с това ограничения по отношение на използването на антибиотици. В допълнение, е изключително атрактивна и предизвикваща широк интерес, темата за потенциала на пчелните продукти по отношение на ползите им за доброто физическо състояние и повишаване на здравния статус на хората. Това определя основата на настоящето изследване на пчелния микробиом за идентифициране на бактериоцин-продуциращи микробни щамове, притежаващи потенциал да инхибират растежа на причинителя на заболяването американски гнилец при медоносните пчели, както и такива притежаващи пробиотичен потенциал.

От друга страна стои изключително популярната в последните години тема за разпространението и масовата употреба на функционални храни съдържащи микроорганизми с пробиотичен потенциал, което в комбинация с нарастващата антибиотична резистентност на бактериите, определя търсенето на продуценти на бактериоцини като алтернатива на традиционните антибиотици, и на други биологично активни вещества с възможен положителен ефект върху здравословното състояние на хората, имунната система и опции за използване при терапия и профилактика на различни заболявания.

На трето място стои подобряването на качествените характеристики на масово използвани ферментирани продукти, което също се опосредства от метаболити най-често произвеждани от млечнокисели бактерии.

И последно, но не и на последно по значимост място, стои фундаментално значимото проучване на микробиома на уникалното за България зелено сирене, чиято употреба е ограничена само в рамките на домашната употреба без строг качествен контрол. Този традиционен продукт може да бъде считан за национално културно наследство и получаването на детайлна информацията за него би могло да е предпоставка за неговото запазване във времето.

### **2.2. Структура на дисертационния труд, убедителност на получените резултати, интерпретациите, изводите и научните приноси**

Дисертационният труд е изготвен съобразно общоприетата схема. Написан е на 231 стандартни печатни страници и обхваща следните раздели, включващи подраздели: Заглавна страница (1 стр.), Благодарности (1 стр.), Съдържание (5 стр.), Списък на таблиците (1 стр.), Списък на фигурите (2 стр.), Списък на използваните съкращения (2 стр.), Въведение (3 стр.), Литературен обзор (65 стр.), Цел и задачи (2 стр.), Материали и методи (37 стр.), Резултати (40 стр.), Обсъждане (23 стр.), Заключение (2 стр.), Обобщение на постигнатите резултати (1 стр.), Изводи (2 стр.), Приноси (1 стр.), Списък на научните публикации във връзка с дисертационния труд (1 стр.), Приложения (23 стр.), Списък на използваната литература (19 стр.). Информацията представена в него е

онагледена с 32 фигури (25, от които в раздел „Резултати“ и 1, в раздел „Обсъждане“) и 17 таблици (11, от които в раздел „Резултати“), които са с достатъчно добро качество. Дисертационният труд е написан на добър научен език, като се наблюдават малък брой чуждици, пунктуационни, технически и стилови грешки и е с достатъчен, за придобиване на ОНС „Доктор“, обем и дори го надхвърля. Наблюдава се дисбаланс по отношение на оптималното съотношение между разделите, като е препоръчително Раздели „Резултати“ и „Обсъждане“ да доминира над „Литературен обзор“, което в случая не е така. Положително впечатление прави разделянето на разделите „Резултати“ и „Обсъждане“ което да покаже възможността на докторанта да интерпретира получените данни и да разграничава получените резултати от тяхното дискутиране, което е важно придобито умение в тази степен на образование.

Използваната литература включва 452 източника, всички на латиница и с малки изключения е спазен еднакъв стил по отношение начина на представяне на библиографската справка. Около половината са от последните 10 години.

**Въведението** показва значимостта на тематиката, дава информация за обектите на изследването и иновативността на някои от подходите, и очертава основите, върху които лежи работата, но при структурирането му липсва плавен логически преход между частите.

**Литературният обзор** е изключително подробен и обхваща всички аспекти от тематиката, на които почива труда. В него са включени детайлни данни за млечнокиселите бактерии, стартирайки от исторически сведения за тях и общи техни характеристики, като са разгледани основните родове спадащи към тях. Дадена е подробна информация за таксономичния и филогенетичния статус, морфологични, физиологични и култивационни характеристики на основните представители на отделните родове, като е представена и ролята им като продуценти на различни биологично активни вещества и вторични метаболити, и възможностите за прилагането на последните в различни сфери на хранително-вкусовата и фармацевтичната промишленост, биотехнологичните производства, и ефектите им върху здравословното състояние на хората, имунната система и потенциала за използване при различни заболявания. Посочено е участието на тези бактерии при ферментацията на различни храни и е дадена връзката между производството на метаболити от тях и органолептичните свойства на редица продукти, както и потенциала им като пробиотични култури, продуценти на различни бактериоцини, противогъбични съединения и др. В светлината на нарастващата антибиотична резистентност на бактериите, специално внимание е отделено на бактериоцините като алтернатива на антибиотиците, като са разгледани основните характеристики на различни класове такива. Анализирани е и връзката между протеолитичната активност на определени млечнокисели бактерии и ролята ѝ във ферментационните процеси при различни храни по отношение на подобряването на качеството на продуктите от една страна и влиянието им върху човешкото здраве, от друга. Засегнати са и благоприятните здравни ефекти при различни състояния като алергии, вирусни инфекции и др., на МКБ и техния пробиотичен потенциал, както и възможностите за прилагането и влагането им във фармацевтични продукти, и функционални храни с цел терапия и профилактика. Тук е добавена и ролята на МКБ от пчелния микробиом и опциите за влагането му като пробиотичен препарат за повишаването на устойчивостта на пчелните семейства към заболявания и взаимовръзката със запазването на пчелните колонии. Не на последно място, подробно са разгледани най-съвременните молекулярно-генетични подходи, които се прилагат при изследвания за определяне на таксономичната принадлежност, филогенетичен, популационен и еволюционен анализ, както и такива за детекция и

определяне на генетични полиморфизми при бактерии и в частност МКБ, а също и за целевото определяне на идентичността на бактериоцини.

Единствената ми забележка по отношение на този раздел е свързана с наблюдаването на известна фрагментираност при структурирането му и наличието на ненужни прекалени подробности в някои от частите му. Това обаче, в никакъв начин не намалява нивото му и възможността да покаже ясно, че докторантката е добре запозната с проблематиката и се доказва освен добрата теоретична подготовка, и способността ѝ да работи с научна литература, за да систематизира наличната информация.

**Целта** на дисертационния труд е ясно формулирана и обезпечена от актуалността на тематиката. Адекватно поставени са и **задачите**, отнасящи се до планираните научноизследователски дейности за постигането на поставената цел.

В раздел **„Материали и методи“** използваните методи са подробно описани, личи, че са адекватно подбрани и отговарят на поставените задачи. Те са представени по начин подходящ за възпроизвеждане на експериментите и включват редица микробиологични, биохимични, секвенционни и други техники. Те отразяват интердисциплинарността на проучването. За част от тях (макар и малка) обаче липсват съответстващи цитати. На места се наблюдават повече използвани обеми, а е препоръчително навсякъде да се ползват крайни концентрации на използваните реактиви. Наблюдават се някои липси, напр. по отношение на изследванията за антибиотична резистентност е добре да се дадат конкретики, а не единствено „определена концентрация от изследваните антимикуробни агенти“ – кои са те и какви са концентрациите. Същото важи и за повече информация за индикаторните бактериални щамове – от къде са придобити, какво подsigурява видовата им идентичност и защо именно те са подбрани. Смятам, че „Колекция от 368 бр. щам млекоисели бактерии беше изолирана от 31 бр. естествено ферментирали млечни продукти“ е част от раздел „Резултати“. Смятам за некоректно употребено „Растежната кинетика на бактериоцини при ниска температура“ – не бактериоцините растат, а бактериите, които ги продуцират.

Въпреки забележките ми, ясно личи големия набор и разнообразие от усвоени микробиологични и молекулярно-генетични техники, както и не на последно място изключително трудоемката биоинформатична обработка на голямо количество данни, което говори за добра методична подготовка на докторантката.

Постигнатите от проведените изследвания резултати са описани последователно и в съответствие с поставените задачи в раздел **„Резултати“**. Изключително подробно и изчерпателно характеризирани е направено на колекцията от бактериални изолати от 45 щам, принадлежащи към род *Enterococcus* добита от медоносни пчели. То включва предварително видово определяне със селективни хранителни среди и PCR анализ, както и доказване на активност срещу *Paenibacillus larvae* и щамова принадлежност. Допълнително детайлизиране на информацията е направено на щам EDD2 принадлежащ към *Enterococcus durans* с включване на секвенционно потвърждаване на неговия таксономичен статус, проверка за фактори на вирулентност, антимикуробна активност и устойчивост на антибиотици, каквато е доказано, че липсва. От представителите на род *Enterococcus* е установено, че 90 бр. от изолатите показват бактериоцинова активност и 21 бр. протеолитична активност срещу 9 бр. индикаторни микроорганизми. Чрез биоинформатичен анализ на геномната последователност на този щам, по отношение на потенциала за продукция на бактериоцини, е установено наличието на клъстери сходни на ентероцин L50A/L50B и ентероцин P. Почти идентични характеристични анализи са направени и с щам на *Enterococcus faecium* EFD. Те показват наличие на антибактериална активност вероятно дължаща се на активността на един или повече от петте открити бактериоцина. По отношение на антибиотичната резистентност, този щам е устойчив само на еритромицин и податлив на останалите изследвани субстанции. Цялостният

анализ за вирулентност на изолатът *Enterococcus faecium* EFD посочва, че той няма функционални патогенни черти и следователно не трябва да се счита за потенциален патоген.

Следвана е сходна схема за характеризиране на микробни изолати от хранителни продукти. Изготвената колекция включва 303 щама, за които първоначално на селективни среди са изследвани техните морфологични и физиологични особености. Тези анализи са последвани от такива за наличие на бактериоцинова и/или протеолитична активност, като сравнително малък процент от щамовете проявяват такива, а е проверено срещу какви и колко бактериални щамове могат да я проявяват. Разработена е схема за активностите и инхибирането на развитието на патогенни микроорганизми наблюдавано при различни групи продукти. Чрез 16S секвенционен анализ е доказана таксономичната принадлежност на 27 щама. Посочени са и филогенетичните взаимоотношения между изолати принадлежащи към *Enterococcus faecalis* и *Lactiplantibacillus plantarum* с изяви на протеолитична и/или бактериоцинова активност. Направен е и допълнителен метагеномен анализ с таксономична анотация за бактериалните видове и видовете гъби (20 бактериални вида и 10 вида гъби) и относителното изобилие от таксонни типове, при микробни изолати от зелено сирене. Характеризирано и оценено е биоразнообразието при бактерии и гъби в партидите зелено сирене.

В раздел „Обсъждане“ е представена интерпретацията на получените данни. За предпочитане е по-детайлно да бъде направена връзката между резултатите и обяснения за тях. Направената дискусия обаче е напълно обосновано базирана на наличните данни в литературата от последните години. Направени са основателно предположения по отношение на селективна защита срещу патогени на изследваните кошери съдържащи щамовете от род *Enterococcus* и споделяне на протективни щамове между кошерите. Направената изключително детайлна на микробните изолати от уникалното за България зелено сирене дава основание да се дадат предположения за ролята на установените микроби както за качеството и производствения процес на самия продукт, така и за потенциала за пробиотична активност. Изследваните партиди сирене се характеризират с от 5 до 25 специфични бактериални вида, а с изключение на една партида се характеризират с 1 до 2 специфични вида гъби в сравнение с останалите сирена. Като цяло зеленото сирене притежава сложен микробиом, който е повлиян от различните климатичните условия и при процеса на зреене основна роля имат микроорганизмите идващи от местната околна среда. За зеленото сирене е установено и едва забележимо присъствие на потенциални патогенни микроорганизми, и най-вероятно не представлява риск за консумация. Наблюдава се известно смесване между „Резултати“ и „Обсъждане“ и някои от посочените в този раздел резултати биха могли да се поместят в предходния такъв, където липсват.

На базата на получените резултати са формулирани 11 *извода* и 5 *приноса*. Изводите следват логично резултатите от проведените изследвания, но биха могли да бъдат по-кратко, по-ясно и дефинитивно формулирани, докато в тях се наблюдава известно преповтаряне с резултатите. Напълно приемам представените в дисертацията приноси.

### **2.3. Съответствието между Автореферата и дисертационния труд**

Авторефератът е изготвен, съобразно изискванията и представя в съкратен вариант проучването, експерименталната работа, получените резултати и направените на тяхната база изводи и приноси.

### **3. Въпроси към докторанта**

Към докторантката имам следните въпроси:

1. При анализа на пчелния микробиом защо сте предпочели да бъдат анализирани в детайли свойствата само видовете от род *Enterococcus*, а не и други микробни изолати?
2. Какви са били конкретните база и критерии за избора само на тази група „най-интересни щамове“ при извършване на видово определяне на избрани изолати с помощта на 16S секвениране (стр. 140) и защо филогенетичните изследвания на изолати чрез RAPD (стр. 141-144) включва избраните изолати само на два вида?
3. Възможно ли е микробни изолати с проявена протеолитична активност, способни да хидролизират белтъците на млякото, да нямат положителен ефект върху хипоалергенността на млечни продукти, а напротив? Защо?
4. На база на постигнатото до момента и имайки предвид необходимостта от допълнителни анализи, в каква насока смятате, че трябва да бъдат насочени бъдещите изследвания?

#### **4. Заключение**

В заключение смятам, че представения дисертационен труд представлява задълбочено изследване по безспорно актуална тематика, включващо съвременни и иновативни техники и носещо след себе си съответстващи приноси за научната област. Показва добрата теоретична подготовка и придобитата широка гама методични умения на докторанта при анализа и решаването на проблеми. Независимо от направените забележки, смятам, че дисертационният труд отговаря напълно на Закона за развитие на академичния състав в Република България, както и на Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в СУ „Св. Климент Охридски“, за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“.

Всичко казано дотук ми дава основание да оценя положително дисертационния труд на Анита Гюрова и да препоръчам на останалите членове на уважаемото Научно жури да подкрепят присъждането на образователната и научна степен „Доктор“ в професионално направление: 4.3. Биологически науки (Генетика – Бактериална генетика и молекулно клониране) на Анита Божидарова Гюрова.

31. 03. 2023 г.  
гр. София

Изготвил рецензията: .....  
/доц. д-р Деница Теофанова/