

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд, представен за защита по процедура за присъждане на образователна и научна степен “Доктор”
по професионално направление 4.3. Биологически науки (Микробиология)

Тема: **„Разработване на биологичноактивни продукти от нови природни източници“**

Автор: редовен докторант **Милена Николова Петрова**

Научни ръководители: **проф. д-р Петя Христова** и **доц. д-р Ганка Чанева**

Рецензент: **проф. д-р Пенка Мончева**

Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски”

Изготвянето на настоящата рецензия е направено съгласно нормативните документи – Закон за развитието на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за неговото прилагане и Препоръките на Факултетния Съвет на Биологически Факултет за критериите при придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в СУ за професионално направление „Биологически науки”.

1.Съвременно състояние на научния проблем и актуалност на дисертационната тема

Бактериалните инфекции при човека, животните и растенията предизвикват сериозни проблеми, свързани не само с общественото здраве, но и със значителни по размери икономически загуби, когато засягат животни и земеделски култури. Борбата с тях в много случаи се оказва трудна и това поставя пред учените сериозни проблеми за разрешаване. В борбата с бактериалните инфекции при животните и човека най-мощното средство са антибиотиците, докато с тези при растенията тяхната употреба е сведена до няколко антибиотика, които вече много рядко се използват при хората и там най-често се прилагат химически вещества, които имат ограничено действие и водят до замърсяване на околната среда. Честата и в много случаи неконтролирана употреба на антибиотици, както и на химически препарати доведе до все по-широко разпространяваща се резистентност на патогенните бактерии към тези средства. Това е много сериозен проблем, с който учени от различни области на науката търсят начини за справяне.

През последните години редица изследователи насочват изследванията си към търсене на нови лекарствени средства с антимикробно действие от природни източници. По този начин се очаква да бъде избегнато усложнението, предизвикано от резистентността на бактериите към традиционно прилаганите антибиотици и химически вещества, а така също и до ограничаване на замърсяването на околната среда. Във връзка с изложеното по-горе, считам че разработването на биологичноактивни продукти от нови природни източници е сериозна и актуална от научна гледна точка задача, която е обект на настоящия дисертационен труд.

2. Оценка на структурата на дисертационния труд, задачите и тяхното съответствие с поставената цел

Дисертационният труд е структуриран по общоприетата схема за такъв род научни трудове и е съставен от следните глави: Увод (2 стр.), Литературен обзор (46 стр.), Цел и задачи (1 стр.), Материали и методи (20 стр.), Резултати и обсъждане (62 стр.), Изводи (1 стр.), Приноси (1 стр.), Списък на използваните литературни източници (477 заглавия) и Приложения към дисертационния труд (22 стр.), включващи допълнителен доказателствен материал (таблицы, фигури, снимки, схеми и др.) към проведените експерименти, рецепти на използвани хранителни среди, списъци на таблицы и фигури, включени в основния текст на дисертацията, списък на използвани съкращения. Илюстративният материал, включен в основния текст на дисертацията е представен от 41 таблицы и 22 фигури. По-подходящо би било списъкът с използваните съкращения да бъде поставен в началото на дисертационния труд, а списъкът с използваната литература - непосредствено след края на основния текст на дисертацията.

Авторефератът обхваща 55 стр. текст и е подготвен съгласно изискванията, като отразява вярно същността на дисертационния труд.

Целта на дисертационния труд е изследване и оценка на антиоксидантната и антимикробната активност на биоактивни вещества от нови природни източници - продукти от микроводорасли и безгръбначни (хемоцианин). Докторантът Милена Петрова си е поставила 7 задачи, подредени в логична последователност, чрез чието изпълнение да се реализира поставената цел. Задачите включват: Изолиране, идентификация и лабораторно култивиране на перспективни щамове микроводорасли; Получаване на екстракти и екзополisahариди от избрани микроводораслови щамове; Определяне на антиоксидантната активност на микроводораслови продукти; Определяне на антимикробната активност на микроводорасловите екстракти и екзополisahариди срещу човешки и растителни патогени; Изследване на антимикробната активност на комбинация от екстракти от микроводорасли; Определяне на антимикробната активност на природни антибиотици по отношение на фитопатогени; Определяне на антимикробната активност на хемоцианин по отношение на човешки патогени.

Считам, че докторантката е проявила умение при планирането и формулирането на задачите, така че те да съответстват на поставената цел и да осигурят нейното постигане.

3. Оценка на използваните методи и съответствието с поставената цел

За изпълнението на поставените задачи е използван много широк набор от разнообразни методи (над 20 основни), подробно описани в глава „Материали и методи“. Те биха могли да се разделят в няколко групи – култивационни, свързани с изолиране и култивиране на микроводорасли, микробиологични, свързани с култивиране на бактерии и определяне на антимикробна активност на получените екстракти и вещества, аналитични, биохимични, молекулярно-биологични, химични

и статистически методи. Те са подбрани подходящо и напълно съответстват на поставените задачи, като гарантират тяхното изпълнение.

4. Оценка на теоретичната обосновка и нейното съответствие с експерименталните решения, получените резултати и формулираните приноси

Увод. В уводната част на дисертационния труд докторантът предоставя кратка и обобщена информация за необходимостта от търсене на нови средства за антимикробна защита, особено на такива от природни източници, като е подчертан неблагоприятният ефект от прекомерната и ненужна в редица случаи употреба на антибиотици и химически вещества, в резултат на което се развива резистентност сред патогените или се замърсява околната среда. Въведението насочва към идеята, залегнала в основната цел на дисертационния труд.

Литературен обзор. Обзорът е структуриран в няколко части, които са взаимно свързани и съответстващи на темата на дисертацията. В частта „Природни източници на антимикробни вещества“ е предоставена обща информация за биологията на микроводораслите и такава, свързана с използването им като източници на биологичноактивни вещества. По-подробно, вниманието е спряно върху видовете микроводорасли, обект на изследване в дисертацията. В тази част е представена информация и за други природни източници на биологичноактивни вещества като висши растения, безгръбначни животни и микроорганизми. Втората част на обзора представя информация за родове и видове патогенни бактерии (тест-микроорганизми, използвани в дисертацията) както човешки, така и растителни, тяхното значение, методи за борба с тях и необходимостта от търсене на алтернативни средства. В третата част на обзора се прави преглед на методите за въвеждане на природни проби в лабораторни условия, като се имат предвид особеностите на работата с микроводорасли, изолирани от природна среда и етапите за достигане до алгологична чиста култура. В последната част, която е най-кратка се обръща внимание върху използването в терапията на комбинации на екстракти от водорасли с оглед на изследване на синергичен ефект. Литературният обзор завършва с кратко обобщение, с което се обосновава насочването на докторанта към разработване на антимикробни продукти от природни източници, каквито са микроводораслите и видът *Eriphia verrucosa*, от който е изолиран хемоцианин. Предоставената информация в Литературния обзор отразява хронологично развитието на научните знания по разглежданите въпроси, но в преобладаващата част тя е актуална и отразява съвременните тенденции по проблематиката на дисертацията. Цитирани са огромен брой публикации (477), от които около 38% излезли от печат между 2011 и 2022 г. Прави добро впечатление отразяването на опита на български изследователи в търсенето на природни източници на антимикробни вещества. Обзорът е илюстриран с 6 таблици и 6 фигури. Огромният обем цитирана литература е предпоставка за придобиване на добра теоретична подготовка на докторанта по третирания проблем.

Резултти и обсъждане. В главата „Резултати и обсъждане“ са представени получените резултати в хода на разработване на дисертацията. Тази глава е структурирана в 7 точки, които не покриват съвсем по дефиниция предварително поставените задачи, което до известна степен затруднява читателя. В т. 1 и 2 от тази глава са представени резултатите от изпълнението на задача 1, свързана с изолирането, култивирането и таксономичната идентификация на използваните и новоизолирани микроводораслови щамове. Две са новоизолираните култури – едната с предполагаема принадлежност към род *Nostoc*, а другата, означена на този етап от изследванията като микроводораслов щам ХПВ – А1. На базата на проведени таксономични изследвания, културата с предполагаема принадлежност към род *Nostoc* е идентифицирана като *Nostoc commune* (с класически методи), а културата означена като ХПВ-А1 като член на семейство *Chlorellaceae*, с най-голяма близост до род *Muriella* (на базата на молекулярно-генетични методи). Като много добър подход искам да отбележа въвеждането на молекулярни методи при идентификацията на микроводорасли, които в допълнение към класическите увеличават до голяма степен успеха на това изследване. В т. 4 на този раздел са представени резултати от анализ на биохимичния състав на две от микроводорасловите култури, като е определено общото количество на белтъци, въглехидрати, липиди и пигменти. Получената информация допълва характеристиките на тези микроводорасли и би могла да бъде полезна в следващи изследвания с оглед на тяхното приложение. За да не изглежда като самоцелно изследване, този анализ би могъл да бъде в състава на отделна задача, предвид твърдението на автора на дисертацията, че тази информация е много важна. По изпълнението на втората задача от дисертационния труд е докладвано, че са получени 14 лиофилизирани продукта на базата на получени водни екстракти, а алкохолните екстракти са 3. Считаю, че резултатите от тази задача е могло да бъдат представени по-подробно в основния текст, вместо читателят да бъде препращан към приложенията.

Третата задача от дисертационния труд е определяне на антиоксидантната активност на получените микроводораслови продукти. За тази цел са определени биохимични показатели, характеризиращи антиоксидантната активност на микроводорасловите екстракти, а резултатите са докладвани в т. 5 от раздела. Като отговорни за антиоксидантната активност е определено съдържанието на общи феноли, флавоноиди и ТАА при *A. africanum*, *N. commune* и ХПВ-А1. Установено е, че алкохолните екстракти, получени от биомасата на изследваните микроводорасли, имат най-силно изразена антиоксидантна активност, съответно максимални количества фенолни и флавоноидни съединения, като тези показатели са най-високи при вида *A. africanum*.

Четвъртата задача на дисертационния труд е определянето на антимицробната активност на екстракти от микроводораслите, срещу човешки и растителни патогени. Резултатите от изпълнението на тази задача са представени в т.6 на тази глава. Като тест-микроорганизми са използвани 44 щамове, от които 28 човешки патогени и 16 фитопатогени. Определянето е проведено по класическия диск-дифузионен метод. Определена е антимицробната активност на 5 екстракти на

A. africanum срещу 25 щама човешки патогени, вкл. сертифицирани и типови щамове. С най-висока активност се характеризира културалната среда, като активност е отчетена срещу 92% от изследваните щамове. С най-ниска активност е алкохолният екстракт. По отношение на фитопатогенните тест-бактерии активна е само културалната среда - срещу 15 от 16 изследвани щама. По подобен начин за антимикробна активност са изпитани екстрактите от *N. commune* и щамът ХПВ-А1. Тук бих искала да спомена, че се открива известно несъответствие между данните, показани в табл. 15 и 16 и текста на стр. 101 (първи абзац), където се твърди, че анализирани екстракти от *N. commune* инхибират по-голяма част от изследваните човешки патогени. Това би могло да се каже само за нискотемпературния екстракт, който инхибира 12 (около 63%) от изследваните 19 щама. При останалите екстракти ефект има при доста по-нисък от 50% от щамовете. При патогенните изолати такъв се отчита само за два 2 щама за НТ и за един за етаноловия екстракт. Всички изследвани екстракти са неактивни спрямо изследваните фитопатогенни бактерии, с изключение на НТ екстракт срещу *C. michiganensis*.

Лиофилизирана културална среда от микроводораслов щам ХВП-А1 в различни концентрации е анализирана за антимикробна активност срещу 10 фитопатогенни бактерии. Логично, най-висока активност и срещу най-голям брой щамове (9 от 10 изследвани) е установена за най-концентрираната културална среда (400 mg/ml). По отношение на човешките патогени са анализирани 5 екстракта (КС, ЕкПЗ, ВТ, НТ, АЕ) които показват слаба активност и то само срещу Грам-положителните бактерии. ВТ и НТ екстракт показват активност и срещу един от Грам-отрицателните изолати. Преобладаващата част от тестваните щамове обаче не показват чувствителност към изследваните екстракти. С най-широк спектър на действие е КС и ВТ екстракт. Четири екстракта (КС, ВТ, НТ и АЕ) са изследвани срещу колекционни щамове фитопатогенни бактерии, както и срещу изолати. Активност притежава само най-концентрираният вариант на КС. Изследването на действието на медния сулфат към фитопатогенните бактерии би трябвало да се коментира само в сравнителен аспект, във връзка с използването му като контрола. Във връзка с изпълнението на тази задача е определянето на минималната инхибираща и минималната бактерицидна концентрация на микроводорасловите екстракти. Определена е МИК и МБК на културална среда на *A. africanum* и екстракти на микроводораслов щам ХПВ-А1. Установено е, че МИК и МБК и на двата щама имат значително по-високи стойности от използваните като контроли антибиотик гентамицин за човешките патогени и меден сулфат за фитопатогените. Във връзка с изпълнението на тази задача бих искала да посоча, че докторантката в съавторство е разработила софтуер за измерване на зоните на инхибиране от снимков материал, което считам за методичен принос.

Като забележка бих искала да посоча, че в заглавията на Табл. 11, 13, 15, 17, 18, 21 и др.) неточно е отбелязано че използваните щамове са типови култури. Справка с каталозите на колекциите, от които те са получени показва, че преобладаващата част са сертифицирани щамове, но малка част от

тях са едновременно и типови кутури. Забележката би била от полза при бъдещо публикуване на получените резултати, където коректното представяне на данните е от изключителна важност.

В т. 6.6. от тази глава са представени резултатите от изпълнението на задача 5, а именно изследването на комбинираното действие на микроводораслови екстракти от културалната среда на *A. africanum* и ХПВ-А1 срещу фитопатогенни бактерии. Не е установен както синергичен, така и антагонистичен ефект на двата екстракта, т.е. ефектът на комбинацията от тях не надхвърля този на всеки един поотделно. Резултатите от изпълнението на задача 6 са представени в следващата точка, неправилно означена като 6.1, вместо 6.7. Това изследване ми се струва малко встрани от целта на дисертационния труд, която е разработване на биологичноактивни продукти от нови природни източници. В тази връзка искам да отбележа, че двата изследвани антибиотика – салиномицин и монензин, са разработени отдавна, единият още през 1967 г, а другият, малко по-късно (през 1983 г). Природните източници, от които тези антибиотици са изолирани се експлоатират отдавна като продуценти на различни биологичноактивни вещества, вкл. антибиотици. Тези антибиотици са известни с антикоксидийното си действие и отдавна са внедрени в употреба в птицевъдството, говедовъдството и др. За тях е докладвано, че са активни срещу вируси, Грам-положителни бактерии, както и някои микроскопични гъби. Напоследък се докладва за антиканцерогенно действие на салиномицина. Известно е също, че проявяват токсичност по отношение на бозайници и растителни клетки. Въпреки това, получени са резултати, които бих определила като допълващи информацията за тяхното антибактериално действие, тъй като е установена активност срещу Грам-отрицателни бактерии за салиномицин. Бих искала да отбележа, че в текста на дисертацията наименованието на антибиотика монензин е изписано неправилно като „монензим“.

Резултатите от изследванията, свързани с последната задача на дисертационния труд са представени в т.7 от тази глава. Изследвана е антимикробната активност на получения нативен хемоцианин и на 5 фракции от него срещу 8 колекционни човешки патогени (6 щам бактерии и два дрожди). Нативният хемоцианин не проявява активност срещу изследваните тест-микроорганизми, докато 5-те фракции са активни само срещу тест-бактериите. Най-висока активност има фракция SU1, която е с висока степен на гликолизиране. Най-чувствителни са видовете *B. subtilis* и *E. coli*. *Изводи.* Изведени са 9 добре формулирани изводи, въпреки че би могло в тях да бъдат посочени и конкретни количествени/качествени характеристики при оценката на един или друг параметър. Изводът под номер 9 е твърде категорично формулиран, въпреки че е направен единствено въз основа на *in vitro* проведени експерименти.

Приноси. Докторантът Милена Петрова е открила 5 приноса на дисертационния труд. Третият принос звучи по-скоро като извод, за който споменах по-горе, че е формулиран твърде категорично. Дефинирането на четвъртия принос е много общо и не разкрива какво е новото, което е постигнато.

5. Критични забележки и препоръки

Критичните забележки и препоръки, отправени към дисертационния труд са отразени в хода на оценка на дисертационния труд (в т. 2 и 4).

6. Въпроси

1. На стр. 74 е подчертано, че изолатът с предполагаема принадлежност към род *Nostoc* е природен изолат, т.е. не е напълно пречистен до алгологично чиста култура. Възможно ли е в такъв случай да бъде коректно определен до вид?
2. Кои полизахариди биха могли да са отговорни за антмикробното действие на екзо- и ендополизахаридните екстракти и какъв е възможният механизъм на тяхното действие?
3. Как би могла да се обясни по-високата чувствителност на колекционните щамове към изпитваните екстракти в сравнение с тази на изолатите?
4. Как би могла да се обясни по-високата антмикробна активност на НТ екстракт от *N. commune*, в сравнение с другите екстракти?
5. Какво се разбира под „бактериостатична зона“ и „зона на задръжка“, която вие установявате при изпитването на някои екстракти и антибиотици по дифузионния метод в агарова среда и как всъщност се определя бактериостатично действие?
6. Предвид много високите стойности на МИК и МБК на различните екстракти в сравнение с тези на антибиотиците и медния сулфат, използвани като контроли, надеждно ли е потенциалото им използване като антмикробни продукти?
7. Под каква форма си представяте използването на различните екстракти за борба с фитопатогенните бактерии?
8. Липсата на антмикробен ефект на нативния хемоцианин е неочкована за вас. Как би могла да се обясни според Вас?
9. Известно е, че много цианобактерии синтезират токсини. Предвид потенциала им за приложение предвиждат ли се изследвания на използваните цианобактерии в тази посока?

7. Публикации във връзка с дисертационния труд

Милена Петрова има две публикации в реферирани списания с импакт фактор /ранг, на една от които тя е първи автор. Те са публикувани в *Biotechnology and Biotechnological Equipment* (IF: 1,34; SJR- 0,376; Q3) и *Oxidation Communications* (IF: 0,465 и SJR = 0.216; Q3), съответно, както и една публикация в сборник от научна конференция, на която тя е първи автор.

Милена Петрова е реализирала дисертационния труд с финансовата подкрепа на два докторантски проекта към Фонд Научни изследвания на СУ „Св. Кл. Охридски“ с нейно участие. Освен това тя

има участия в две национални научни програми и един научен проект към Фонд Научни изследвания към МОН, които не са пряко свързани с темата на дисертационния труд.

8. Съответствие на придобитата компетентност с изискванията на образователната и научна степен „доктор”.

В хода на докторантурата Милена Петрова е усвоила нови знания в конкретната научна област: разработване на биологичноактивни продукти от природни източници – микроводорасли и безгръбначни животни, продуциращи хемоцианин. Усвоила е теоретични знания относно основни биологични особености на микроводорасли – таксономия, биохимичен състав и др. Тези знания в комбинация с познанията по микробиология са допринесли за разработването на настоящата дисертация.

За изпълнението на поставените задачи се изисква комплексен подход с приложението на голямо разнообразие от методи – таксономични за идентифициране на част от микроводорасловите култури, микробиологични, аналитични, биохимични, молекулярно-генетични, статистически, химически и др. Считаю, че овладяването и приложението на толкова богат набор от методи несъмнено е повишило нейната методична компетентност, а това е важно за бъдещето ѝ кариерно развитие.

Въпреки че една част от анализите са колективни, в цялостното представяне на дисертацията се откроява личното участие на Милена Петрова, което показва че тя е придобила умения да оформя, представя, анализира, дискутира и обобщава научни резултати.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Въз основа на посоченото по-горе изразявам своята положителна оценка на дисертационния труд – по отношение на актуалност на проблема, обект на дисертационния труд, задачите за неговото разработване, методичните подходи, експерименталните постановки, получените резултати, тяхното интерпретиране. Отправените от мен критични бележки не намаляват научните достойнства на този труд и считам, че биха били от полза при бъдещи изследвания в тази област. Убедено считам, че рецензираният от мен труд на докторанта Милена Петрова е авторски труд, отговарящ на всички критерии за докторска дисертация.

Във връзка с това, препоръчвам почитаемото Научно жури, назначено със Заповед № РД 38-389 / 13.07.2022 г. на Ректора на СУ „Св. Климент Охридски“, да присъди на Милена Николова Петрова образователната и научна степен „доктор”.

09.09.2022 г.

София

Рецензент:

(проф. д-р Пенка Мончева)