

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д-р Светла Данова, дн.

Институт по Микробиология „Стефан Ангелов“

на дисертационен труд на тема:

РАЗРАБОТВАНЕ НА БИОЛОГИЧНОАКТИВНИ ПРОДУКТИ ОТ НОВИ ПРИРОДНИ ИЗТОЧНИЦИ

Представен от **Милена Николова Петрова** за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“ в област 4 „Природни науки, математика и информатика; професионално направление 4.3. „Биологически науки“ Докторантска програма:

“Микробиология“

С научни ръководители: проф. д-р **Петя Койчева Христова**

доц. д-р **Ганка Годорова Чанева**

ОТНОСНО ПРОЦЕДУРАТА:

Настоящата процедура по придобиване на ОНС „Доктор“ се провежда на основание чл. 4 от ЗРАСРБ, във връзка с §7 от Преходните и заключителни разпоредби на Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в СУ „Св. Кл. Охридски“, Съгласно Заповед (№РД-38-389/13.07.2022.) на Ректора на Софийски Университет „Св. Климент Охридски“ съм избрана за член на Научно жури по горепосочения конкурс и съм определена за рецензент на първото му заседание. В качеството ми на такава, декларирам, че не съществува конфликт на интереси по смисъла на §1, т.2 от допълнителните разпоредби на ЗРАСРБ между мен и кандидата по процедурата за ОНС „Доктор“ и за мен не са налице ограниченията по чл.33 от ЗРАСРБ. Представеният ми комплект документи и материали на хартиен и електронен носител отговаря на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България и Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и за заемане на академични длъжности в БФ-СУ. Доказано е по законоустановения ред отсъствие на плагиатство в научните трудове на кандидатката.

АКТУАЛНОСТ И ЗНАЧИМОСТ НА РАЗРАБОТВАНАТА ТЕМАТИКА

Представеният ми за рецензия дисертационен труд е с амбициозното заглавие **Разработване на биологичноактивни продукти от нови природни източници**. Колективът се опитва да допринесе в решаването на две сериозни научни предизвикателства:

(1) Неотложна необходимост от търсене на нови лекарствени продукти в борбата с хранителните патогени и растящата антибиотична резистентност при микроби от различни хабитати, породена от увеличаване и неконтролиран прием на антибиотици;

(2) здравето на растенията и последствията от използване на пестициди по отношение на болестотворните микроорганизми, които допринасят за експанзията на кръстосаните патогени и спешната нужда да се намерят комплексни биологично-съобразни решения ограничаващи тази негативна за здравето на консуматорите верига.

В тази връзка разработката търси възможности в потенциала на хемоцианини от безгръбначни и на микроводораслите техните метаболити и клетъчни фракции. Независимо от факта, че това са основополагащи изследвания те са оригинално съчетани и генерират добра основа за последващи за развитие в бъдеще и постигане на готови за внедряване продукти, както насочва заглавието. Всичко това ми дава основание да оценя като нетрадиционна и много актуална разработката.

ОБЕМ И СТРУКТУРА НА ДИСЕРТАЦИЯТА

Дисертационният труд е добре подреден и структуриран и отговаря на утвърдените изисквания. Изложението на материала в дисертацията е оформено на 182 стр. и включва: *Увод* – 3 стр.; *Литературен обзор* -47 , *Цел и задачи* - 1 стр.; *Материали и методи* – 20 стр., *Резултати и обсъждане* – 60 стр. ; *Изводи* – 1 стр., *Приноси* -1 стр. ; *Литература*- 22 стр. и *Приложения* - 21 стр. Материалът е богато илюстриран с 22 фигури, и 44 таблици. Благодарение на приложените списък на фигурите -2 стр и списък с таблиците -2 стр. данните обобщени в дисертацията могат лесно да бъдат намирани и анализирани. Единствено бих предложила чисто технически *Листа с използваните съкращения* и тези с таблици и фигури да бъдат поставени в началото, а не като последни в края на *Допълващо приложението* и труда. Дисертацията е написана ясно, на добър научен език и стил. Добро впечатление прави и логическата подредба в литературния обзор и в цялостното оформяне на резултатите

ЛИТЕРАТУРНА ОСВЕДОМЕНОСТ И ПОСТАНОВКА НА ЦЕЛТА И ЗАДАЧИТЕ

Литературният обзор на дисертацията обстойно и систематизирано представя природните източници на антимикробни вещества, които са обект на изследване – микроводорасли, безгръбначни животни, продуценти на хемоцианини, висши растения и микроорганизми. Обобщени са и таргетите за търсените активни продукти: патогенни бактерии - човешки и фитопатогенни.

В логическа последователност докторантката е разгледала: „*Методи за въвеждане на природна проба в лабораторни условия*“ и „*Възможностите на комбинирана терапия с екстракти от микроводорасли*“. Тази структура показва добре обмислена научна рамка в

разработката, съчетанието на добро познаване на теорията и стремеж за оценка на новите подходи в решаване на очертаните предизвикателства, свързани с нуждата да се намерят нови биологично-активни продукти.

Отлично впечатление прави познаването на новостите в таксономичната класификация на цианобактериите и цитирането на предхождания български опит. Обобщена е много научна литература. Цитирани са огромен брой дори и за голяма докторста дисертация, 477 литературни източника. От тях 19 са на български език и те заедно с други представят българския опит по изследваните проблеми. Така ясно може да се очертае надграждащите изследвания, осъществени от докторантката. Правилно структуриран и обтоен обзорът логически води до формулиране целта на дисертационния труд.

Докторантката е насочила усилията към *„Изследване и оценка на антиоксидантната и антимикробната активност на биоактивни вещества от нови природни източници - продукти от микроводорасли и безгръбначни (хемоцианин)“*. За реализирането и са поставени 7 ясно дефинирани експериментални задачи.

1 *Изолране, идентификация и лабораторно култивиране на перспективни щамове микроводорасли;*

2 *Получаване на екстракти и екзоползахариди от избрани микроводораслови щамове;*

3 *Определяне на антиоксидантната активност на микроводораслови продукти;*

4 *Определяне на антимикробната активност на микроводорасловите екстракти и екзоползахариди срещу човешки и растителни патогени;*

5 *Изследване на антимикробната активност на комбинация от екстракти от микроводорасли;*

6 *Определяне на антимикробната активност на природни антибиотици по отношение на фитопатогени;*

7 *Определяне на антимикробната активност на хемоцианин по отношение на човешки патогени.*

ОЦЕНКА НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Решаването на поставените задачи е основано на панел от изледователски подходи при съчетаването на различни методи, в пълно съответствие с интердисциплинарния характер на дисертацията. Докторантката използва 3 вида микроводорасли и е подбрала голяма група микроорганизми както следва :6 изолати от хранителни продукти: *E. coli*, *Bacillus* sp., *Listeria* sp., *Enterococcus* sp., *Staphylococcus* sp.; 1 щам, изолиран от замърсени води: *P. Aeruginosa*, и щамове на 4 вида фитопатогенни бактерии: *Xanthomonas gardneri* 62t, X.

gardneri 64t, *X. euvesicatoria* 105t, *X. euvesicatoria* 269p, *X. vesicatoria* 68t, *X. vesicatoria* 60t и *P. syringae* pv. *tomato* 32f. Впечатляващ е броят на тест – културите от човешки патогени (9 Грам-положителни и 10 Грам-отрицателни бактериии, 4 вида дрожди, представители на род *Cryptococcus* и под *Candida*) както и фитопатогенни бактерии(9 Грам-отрицателни – и 1 видГрам-положителни: *Clavibacter michiganesis*) срещу които е търсен инхибиторен ефект. Този подбор е добре обоснован с високия патогенен потенциал на видовете.

Методичните подходи за оценка на биологичната активност са правилни. Описани са модификациите на класическите микробиологични методи за оценка на активност по метода дифузия в агар, с оглед спецификите в охарактеризиране на различните микроводораслови фракции. Правилно са оценени минимална инхибираща и минимална бактерицидна концентрация. Подборът на хранителни среди за микробните тест –култури и експерименти с тях е правилен и изпълнен с подчертан стремеж за обективност и възпроизводимост. Специално искам да подчертая създадения алгоритъм с математически модел за оценка на зоните за инхибиция по снимков материал. Оценявам го като много добро авторско решение и показва изградени умения на микробиолог, който успешно решава проблеми, в търсене на нови решения.

Усвоени са както класически микробиологични техники по пречистване, култивиране и таксономично определяне на микроводорасловите щамове, така и съвременни молекулярни методи- PCR и секвенционен анализ на гени признати като златен стандарт в таксономичните изследвания. Прави добро впечатление отбелязаните анализи в рамките на магистърска дипломна работа и с помощта на специалисти от Институт по Физиология на растенията –БАН,. които са позволили на докторантката да усвои нови знания в областта на микроводораслите.

Коректно е посочено, че хемоцианин екстрактите са предоставени от лаборатория „Структурен органичен анализ“ към „Институт по органична химия с център по фитохимия“, БАН.

Докторантката прилага и различни биохимични методи: Получаване на екстракти от микроводораслова биомаса, изолиране на ендополизахарид; определяне на абсолютно сухо вещество, на Белтък по Лоури; на количеството на общи липиди, съдържанието на фотосинтетични пигменти при водорасловите екстракти. Докторантката успешно съчетава 2 различни метода за оценка на антиоксидантната активност - DPPH-радикал-улавяща активност и тотална антиоксидантна активност (ТАА).

ОЦЕНКА НА ПОЛУЧЕНИТЕ РЕЗУЛТАТИ

Резултатите от дисертацията условно можем да разглеждаме в 3 раздела

(1) подбор, изолиране и охарактеризиране на микроводорасли –продуценти на активни вещества при което са изследвани 3 щама микроводорасли, два от които са изолирани от околната среда и са таксономично определени и 1 изолиран от докторантката;

(2) получаване на общо 16 екстракта, за целите на дисертацията

(3) лабораторна оценка на антимикробна и антиоксидантна активност на различните екстракти.

Изложението де факто слива първите два условно очертани раздела от експерименталната част. Интересен казус е решен по отношение идентификацията на ХПВ -А1. Безспорен интерес представляват резултатите с идентификацията на този изолат. Високо оценявам полифазния подход, съчетаващ класическата морфо-физиологична с генетична идентификация и включването на секвенционния анализ не само на двата таксономично-значими участъка ITS но и на гена *gbcL*.

Успешно са решени задачите за получаване на екстракти и екзополизахариди от 3^{те} микроводораслови щама и задачите по определяне на антиоксидантната активност на получените екстракти. Прави добро впечатление преценката на Милена Петрова, кои от екстрактите имат обещаваща антиоксидантна активност. Това са нови данни защото антиоксидантните свойства на микроводораслите са все още слабо проучени. Обективно са оценени, алкохолните екстракти, получени от биомасата на изследваните микроводорасли, като най-добри антиоксиданти с максимални количества фенолни и флавоноидни съединения.

С важно практическо значение са резултатите по определяне на антимикробната активност. Създаденият панел от 44 щама тест-микроорганизми, от които 28 са патогенни за човека, а 16 са фитопатогени, причиняващи заболявания по овощни и земеделски култури очертава много висок инхибиторен потенциал. В стремежа да се оцени обективно антимикробния потенциал на новите екстракти докторантката търси и създава *Нов метод за определяне на зона на инхибиране по снимков материал*, съвместно с математичи. Методът е валидиран, доказано е ефективен и резултатите са докладвани на научен форум. Създаден е ценен алгоритъм за стандартизиране на резултатите на агар-дифузионния метод и препоръчвам той да стане достояние на широката научна общност. Доказателство са получените резултати. Докторантката оценява по 6 продукта от всеки един от трите вида микроводорасли - четири са от биомасата (високо-температурен екстракт, ниско-температурен екстракт, ендополизахарид и алкохолен екстракт), безклетъчната супернатанта и екзополизахарид. Създаден е алгоритъм за оценката има който включва:

(1) Определяне на микробна чувствителност към екстракти в два варианта - Антибактериална активност срещу фитопатогенни бактерии и срещу човешки патогени

оценени срещу контроли меден сулфат за фитопатогените и антибиотик-гентамиин за човешките патогени

2) Минимална инхибираща концентрация (MIC) и минимална бактерицидна концентрация (MBC) на микроводораслови екстракти

Прави много добро впечатление обобщението, което е направен за всеки един от трите микроводорасли разработвани в дисертацията. Получените резултати допълват информацията за биологичната активност на *Nostoc commune Vaucher* и *Arthonema africanum*. Докторантката е включила изпреварващо нови за страната ни фитопатогени, което прави много ценни получените резултати. Нещо повече потърсен е синергичен ефект на подбраните като най-активни микроводораслови екстракти срещу фитопатогенни бактерии, комбинирайки ги в различни концентрации. Анализите са извършени срещу три щамове фитопатогенни бактерии : *X. euvesicatoria* 269р и *P. syringae* pv. *tomato* 32f и *E. amylovora* НБПМКК8492.

Отчитам като оригинален елемент в частта с антимикробна активност, включването на фракции хемоцианини, получени от морски раци *Eriphia verrucosa*, които са събрани в района на Камчия, Черно море. Така е разширена групата от нови-охарактеризирани биологично активни вещества, които докторантката определя като потенциални продукти.

ПРИНОСИ И ЗНАЧИМОСТ НА РАЗРАБОТКАТА ЗА НАУКАТА И ПРАКТИКАТА

Направените 9 извода и 5 приноса са логично следствие от цялата разработка и дават обективна информация за стойността на проведените изследвания. Те са формулирани ясно и точно. Получените резултати могат да послужат като основа за разработване на продукти за растителна защита, което Милена Петрова сякаш е поставила като дългосрочна цел със заглавието на дисертационния труд. На етапа на представения труд, все още не може изпитваните екстракти да бъдат обобщени като готов продукт.

КРИТИЧНИ БЕЛЕЖКИ, ВЪПРОСИ И ПРЕПОРЪКИ

Дисертационният труд е актуален и безспорно представлява една оригинална интердисциплинарна разработка в съответствие с изискванията на ЗРАСРБ и Правилниците към него. Без това да намалява достойствата бих направила няколко препоръки и критически бележки, за бъдещо развитие на тематиката и представянето на безспорно добрите резултати:

Докторантката е много пестелива в дискусията на резултатите. Напр. в раздела по идентифициране и проучване на биохимичния състав на микроводораслите би било добре да се сравнят получените данни с тези за други микроводорасли. Трудът има полезна информация за състава на микроводораслите, което би било добре да се оцени също във

връзка с получаваните екстракти и вероятната природа на биологично-активните метаболити/екстракти. Никъде не е отбелязан един важен продуктов показател - добивът на биомаса, особено при този дълъг растежен цикъл на микроскопичен по своите размери шам, и добивът на биологично –активни екстракти, които да водят към желаните нови продукти. Така значим обем от работата остава сякаш встрани от целта и заглавието на дисертационния труд.

Единствено в приносите е отбелязано кои резултати са получени за първи път. А такива безспорно има и е добре да бъдат очертани в дискусията. В тази връзка бих попитала докторантката, възможно ли е ХПВ -А1 изолатът да се окаже нов вид от семейство *Chlorellaceae* и близкородствен с посочените от род *Muriella*. Бих препоръчала по-смело да се представят оригиналните/авторски елементи по експерименталните протоколи.

На база сравнителната оценка на микроводораслови екстракти и хемоцианини, кои имат по-голям потенциал за приложение?

Каква е причината получените данни по оценка на антиоксидантната активност, заложена като цел на дисертацията да не намерят място в направените изводи?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд съдържа **научни и научно-приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката и отговарят на всички** изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и съответните Правилници на БФ и СУ.

Дисертационният труд недвусмислено показва, че докторант Милена Петрова притежава теоретични знания и професионални умения на микробиолог и молекулярен биолог, като демонстрира подготвеност за самостоятелно провеждане на научно изследване вкл. и да решава научни предизвикателства.

Въз основа на гореизложеното давам своята **положителна оценка** на дисертационния труд и **предлагам на почитаемото научно жури да присъди образователната и научна степен „Доктор“** на редовендокторант Милена Петрова в област 4 „Природни науки, математика и информатика; професионално направление 4.3. „Биологически науки“ (Микробиология)

09.09.2022 г.

Рецензент:.....

(проф. С. Данова, дбн)