

## 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 „Доктор“ по докторска програма „Микробиология“. Професионално направление 4.3 „Биологически науки“ Област на висшето образование 4. „Природни науки, математика и информатика“.

Със заповед № РД-38-360 от 07.07.2025 г. на Ректора на Софийския университет „Климент Охридски“ съм определена за член на научното жури.

Автор на дисертационния труд: **Мария Илиева Пандова**

Заглавие на дисертационния труд „**Ентерококите - на границата на полезното и вредното**“

Научен ръководител: **проф. д-р Петя Христова**

### 1. АКТУАЛНОСТ И ЗНАЧИМОСТ НА РАЗРАБОТВАНИЯ ПРОБЛЕМ

Ентерококите са грам-положителни бактерии, които обикновено се срещат като членове на микробиотата на хора и други животни. Те могат да бъдат открити и в околната среда, както и свързани с храна. Родът *Enterococcus* обхваща група грам-положителни бактерии, които са от голямо значение за човешкото здраве поради ролята си на основни причинители на инфекции, свързани със здравните грижи. Ентерококите са устойчиви и универсални видове, способни да оцелеят при тежки условия, което ги прави добре адаптирани към здравната среда. Два вида причиняват по-голямата част от ентерококовите инфекции: *Enterococcus faecalis* и *Enterococcus faecium*. И двата вида демонстрират присъща резистентност към често срещани антибиотици, като почти всички цефалоспорини, аминогликозиди, клиндамицин и триметоприм-сулфаметоксазол. Освен това, забележително пластичният геном позволява на тези два вида лесно да придобият резистентност към други антибиотици, като например високо ниво на резистентност към аминогликозиди, високо ниво на резистентност към ампицилин и резистентност към ванкомицин, или чрез мутация, или чрез хоризонтален трансфер на генетични елементи, придаващи детерминанти на резистент. Въпреки това, *E. faecium* се е превърнал от симбиотичен организъм в опасен опортюнистичен патоген, особено в

болничната среда , представляващ сериозно предизвикателство за съвременното здравеопазване поради нарастващата глобална заплаха от антимикробна резистентност (AMR). За разлика от своя аналог *Enterococcus faecalis*, се превърна в сериозен проблем поради честата си връзка с мултирезистентни фенотипи и ограничените възможности за лечение, особено при критично болни и имунокомпрометирани пациенти, които се подлагат на продължителна антимикробна терапия и/или прекарват дълъг период в болница. Селективният натиск, причинен от широкото използване на антимикробни средства при хора, животни и в селското стопанство - е увеличил честотата на резистентност към различни лекарства сред ентерококовите видове. CRISPR-Cas системата, важен прокариотен защитен механизъм срещу навлизането на мобилни генетични елементи, може да предотврати придобиването на гени, участващи в антимикробната резистентност и вирулентността. Тази система се използва все по-често като инструмент за редактиране на гени, който може да се използва като начин за разпознаване и инактивиране на гени от интерес. Всичко това 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 198 стандартни страници текст. Спазена е общоприетата схема и препоръчителните съотношения между отделните части на труда, както следва:

- *Въведение* – 2 стр.;
- *Литературен обзор* – 51 стр.;
- *Цел и задачи* – 1 стр
- *Материали и методи* – 16стр.;
- *Резултати и обсъждане* – 63 стр.;
- *Изводи* 1 стр.

Дисертацията съдържа приложения, 39 фигури и 16 таблици.

Библиографията включва 500 цитирани литературни източника. Експерименталната работа е извършена в лабораториите на Катедра по обща и промишлена микробиология при Софийския университет „Св. Климент Охридски“.

### **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 50 страници в литературния обзор. Обзорът представя детайлно състоянието на проблема и доказва необходимостта от разработването на дисертационната теза. Литературният обзор се състои от четири раздела. Представена е обща характеристика на таксономични белези на бактериите от род *Enterococcus*. Разгледани са ентерококите като причинители на вътреболнични заболявания и клинични заболявания, асоциирани с ентерококите. В тази връзка се дискутират факторите, определящи вирулентния потенциал при ентерококите и придобитата антибитична резистентност при ентерококите. Представената информация за условия за хоризонтален трансфер на гени и CRISPR системите и връзката им с антибиотичната резистентност при ентерококите е много информативна. В следващият раздел са дискутирани и положителни свойства на ентерококите, тяхното присъствие в храни за хора и животни. В частта ентерококови продукти с положителен ефект върху човешкия организъм подробно са разгледани подробно бактериоцини и тяхната класификация. Счита се, че цитираните ентерокоцини в всички групи бактериоцини е доста спекулативно, защото не всички ентерокоцини са достатъчно проучени. Авторката предлага приложение и регулация на ентерококите на пазара и тяхната безопасност. Литературният обзор е конкретен, структуриран е правилно, следва логически не само целта, но и за формулировката на задачите. Поставени са за решаване добре обосновани 3 експериментални задачи. Литературата (както в обзора, така и в целия труд) е тясно свързана с темата на дисертационния труд. 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 изследвания. Изолатите са идентифицирани чрез три различни метода: PCR с родово- и видово- специфични праймери, 16S rPHK секвениране и MALDI-TOFF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight) мас спектрометрия. Чрез PCR е детектирано наличието на три CRISPR локуса (CRISPR1, CRISPR2 и CRISPR3) и асоциираните *cas* гени за

CRISPR1 и CRISPR3. Анализирани са наличието на гени за полови феромони (*cpd*, *cob* и *ccf*), агрегационни вещества (*agg*, *asa1*, *prgB* и *asa373*), Tn916–1545 транспозонното семейство (*Int-Tn*, интегразния ген) и феромон-индуцируемия плазмид pCF10 (*prgW*, гена за инициаторния белтък на репликация), определящи възможността на изолатите за трансфер на гени за антибиотична резистентност и вирулентност. Извършен е PCR за детектиране на 8 гена за вирулентност (*cylB*, *esp*, *gls24*, *nucl1*, *psaA*, *agg*, *gelE*, и *ace*) в анализирани изолати. Извършен е PCR за 9 гена, свързани с антибиотичната резистентност (*erm*, *ermB*, *blaZ*, *vanA*, *aphA*, *mefA*, *gyrA*, *catpIP501*, и *aacB'-aph2''*), общо представени в клинични и природни щамове на ентерококи. Проведено е целогеномно секвениране и биоформатична обработка на селектирани секвенциите на 4 щамове *E. faecalis* и 2 щамове *E. mundtii*. Определена е антибактериалната активност на ентерококовите щамове спрямо тест микроорганизми (*Listeria innocua* NBIMCC 8755, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* NBIMCC 8692 и *Staphylococcus aureus* ATCC 6538) За определяне на физико-химичните характеристики на антибактериалното вещество, както и неговата природа, е анализирана активността им спрямо различни температури, съфактантни и ензими.

Всички това ми позволява да дам висока оценка на научното ниво и на отличната подготовка, 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

Целта на настоящата дисертация е детайлна характеристика на видове от род *Enterococcus* с оглед установяване на биологичните им свойства, разкриващи тяхната двойствена природа – като полезни или вредни микробни агенти. За постигане на целта са формулирани 3 задачи:

1. Изолване и идентифициране на ентерококови изолати от различни хабитати.

2. Изследване на характеристики на ентерококите, асоциирани с потенциал за причиняване на заболявания.

3. Изследване на характеристики на ентерококите, асоциирани с пробиотичния потенциал.

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 изследване. Обект на настоящото изследване са 72 ентерококови щамове, изолирани от 7 различни екологични ниши.

Въз основа на приложените подходи в анализираната колекция са идентифицирани 11 ентерококови вида: *Enterococcus mundtii*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus gilvus*, *Enterococcus pseudoavium*, *Enterococcus pallens*, *Enterococcus malodoratus*, *Enterococcus devriesei*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecium* и *Enterococcus faecalis*.

Степента на патогенност на микроорганизмите зависи от генетично детерминирани гени за вирулентност. В настоящото изследване е анализирано наличието на 8 гена за вирулентност (*cylB*, *esp*, *gls24*, *nucl1*, *psaA*, *agg*, *gelE* и *ace*) в ентерококовите изолати. Целогеномното секвениране на четири изолата, представители на вида *E. faecalis* (CM4, BM5, BM12 и BM15) позволява да бъдат детектирани допълнителни гени за вирулентност, извън изследваните чрез PCR. Резултатите от това проучване показват, че потенциално растително-асоциираните ентерококови изолати в интестиналния тракт на охлюва и в храните (като *E. casseliflavus*) не носят гени за вирулентност. Хемолитичната активност на ентерококовите видове се смята за един от основните вирулентни фактори, определящи техния патогенен характер. За проучване на вирулентния потенциал на ентерококите е анализирана продукцията на желатиназа и наличието на *gelE* ген. Генът *gelE* детерминира експресията на екстрацелуларна желатиназа, която хидролизира желатин и колаген, както и други белтъчни субстрати. Положителна амплификация за *gelE* е получена при 35% от всички тествани изолати. Нуклеазите се считат за важен фактор във вирулентния потенциал на бактериите, както и за уникален маркер, широко използван при детекцията на някои бактериални видове в храни и клинични изолати. Вирулентният потенциал и антибиотичната резистентност при ентерококите е зависима от видовата принадлежност и произхода на щамовете. Фенотипната антибиотична резистентност на изследваните ентерококови изолати е определена съгласно процедурата на EUCAST. В това изследване всички изолати са чувствителни към флуорохинолонови антибиотици (ципрофлоксацин, левофлоксацин и норфлоксацин), тейкопланин, линезолид, нитрофурантоин, ванкомицин и имепенем. Гените за антибиотична резистентност са разпространени в повече от половината от анализирани щамове. Изолатите, показващи наличие на един или на повече от един ген за антибиотична резистентност, представляват 54% (n=39) от изследваната ентерококова популация. Рискът за придобиване на потенциално опасни инфекции от ентерококови изолати е най-добре изразен при вида *E. faecalis*, поради откриване на значимо количество експресиращи се гени за вирулентност и антибиотична резистентност. Статистическият анализ на резултатите показва, че разпространението на гените за антибиотична резистентност е значително по-

голямо в щамове от вида *E. faecalis* и е зависимо от екологичните ниши, които обитават ентерококите. Изолатите от човешки произход (кърма) се характеризират с най-висок вирулентен потенциал и антибиотична резистентност. Растително-асоциираните ентерококи, като *E. mundtii* и *E. casseliflavus*, показват най-малък потенциал за предизвикване на бактериални инфекции. Всички щамове от настоящото изследване са тествани за наличието на CRISPR локуси и техните асоциирани CAS белтъци чрез конвенционален PCR. Наличните резултати показват, че 42% (n=30) от всички тествани щамове притежават поне един CRISPR локус в техните геноми. Повечето детектирани CRISPR системи не са активни поради липсата на Cas белтъци и на самотаргетиращи спейсъри, което прави изследваните ентерококови щамове чувствителни към бактериофаги и способни за придобиване на екзогенна ДНК под формата на плазмиди.

CRISPR системите са широко описвани в литературата както като предпазващи от фагови инфекции, така и от друга страна като механизъм, формиращ бариера за хоризонталния трансфер на гени, тъй като тези системи могат да възпрепятстват приема на плазмиди и друга екзогенна ДНК. Във всички тествани щамове (с изключение *faecalis* BM15) в това проучване липсват CRISPR системи или има нефункционални такива (нямат *cas* гени). Детектирането на *cas* гени в една от CRISPR системите (*E. faecalis* BM15) предполага активност на системата срещу фагова ДНК, но не и срещу гените, носители на антибиотична резистентност.

Детекцията на неактивни CRISPR системи в един от плазмидите на един от щамовете (*E. faecalis* BM5) подсказва потенциална алтернативна роля на CRISPR системите в конкуренцията на плазмидите в клетката или за трансфера на тези системи. Резултатите в това проучване описват няколко аспекта, индикиращи наличието на екзогенна ДНК под формата на плазмиди, мобилни генетични елементи или гени за антибиотична резистентност и вирулентност във връзка с неактивни CRISPR системи. Анализиранияте спейсъри потвърждават плазмидни целеви участъци само в един от четирите секвенирани щамове, докато във всички CRISPR локуси са детектирани самотаргетиращи спейсъри. Тези резултати основно описват придобиването на екзогенна ДНК като следствие от CRISPR инактивация, а самотаргетиращите спейсъри като основната причина.

Следващите анализи в тази дисертация са свързани с определяне на потенциала на ентерококите за използването им като пробиотици срещу патогенни микроорганизми. Представители на вида *E. mundtii* са характеризирани като безопасни продуценти на антибактериални вещества, активни срещу *L. innocua* и имат потенциал да бъдат използвани като пробиотици или биоконсерванти в храни.

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 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 успешен 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 е проведено проучване за CRISPR системите в ентерококови популации в България, което ще спомогне за характеризирането на устойчивостта на тези микроорганизми към бактериофаги и за потенциала им да придобиват мобилни генетични елементи. Мария Пандова е автор на две научни публикации, като в тях е водещ изследовател и 6 участия в научни форуми, което показва творческата и изследователската и активност при изработването и оформянето им. Забелязана е цитируемост на публикациите.

- **Pandova, M.;** Kizheva, Y.; Hristova, P. Relationship Between CRISPR–Cas Systems and Acquisition of Tetracycline Resistance in Non-Clinical Enterococcus Populations in Bulgaria. *Antibiotics* **2025**, 14, 145.
- **Pandova, M.;** Kizheva, Y.; Tsenova, M.; Rusinova, M.; Borisova, T.; Hristova, P. Pathogenic Potential and Antibiotic Susceptibility: A Comprehensive Study of Enterococci from Different Ecological Settings. *Pathogens* **2024**, 13, 36.

### Към дисертанта имам няколко въпроса:

1. *Бактериоцините имат определени ограничения, при мащабно производство, пречистване, разходи, липса на оценки за цитотоксичност и ограничен спектър на активност. Преди всичко, чувствителността на бактериоцините към човешки протеази ги прави неактивни. Какви биоинженерни методи могат да се справят с тези предизвикателства?*

*Използва ли се имобилизацията върху различни носители, капсулиране в биополимер и/или*

нанасяне на полиелектролитно покритие са предпочитани методологии?

2. Въпреки че механизмите, чрез които бактериите развиват резистентност към бактериоцини, все още не са напълно изяснени, резистентността към бактериоцини може ли да възникне и от фактори на околната среда?
3. Какви методи за пречистване на бактериоцини се използват и какви са използвани при изучаването им при вида *Enterococcus mundtii*?
4. Какви киселинни присъстват в културална среда на щамовете *Enterococcus mundtii* и как са определени?

## 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 рецензираният дисертационен труд представлява оригинална научна разработка, с теоретично и приложно значение. Предложената дисертация е доказателство, че Мария Пандова е развила компетентности необходими за присъждане на образователната степен доктор включващи теоретична подготовка, методологични познания, самостоятелност и опит за планиране на експерименти и способност за анализ на резултатите.

Дисертационният труд съдържа научни, научно-приложни и приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката и отговарят на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), и съответния Правилник за условията и реда за придобиване на научни степени в СУ „Св.Кл.Охридски“ и давам своята висока оценка и препоръчвам на членовете на научното жури да присъдят на дисертантката **Мария Пандова** образователната и научна степен „Доктор“ по професионално направление 4.3. Биологически науки, Специалност Микробиология

20.09.2025 г.

Подпис: .....

Проф. Искра Иванова

