

РЕЦЕНЗИЯ

от доц. д-р Венцислава Янкова Петрова, Биологически факултет, Софийски университет „Св. Климент Охридски“

на докторска дисертация на тема:

„ЕНТЕРОКОКИТЕ - НА ГРАНИЦАТА НА ПОЛЕЗНОТО И ВРЕДНОТО“

за присъждане на образователната и научна степен „доктор“ в област на висше образование: 4. Природни науки, професионално направление: 4.3. Биологически науки, докторска програма: Микробиология

Автор на дисертационния труд: Мария Илиева Пандова, докторант в БФ на СУ „Св. Климент Охридски“

Научен ръководител: проф. д-р Петя Христова

Декларирам, че нямам конфликт на интереси по смисъла на чл. 4, ал. 5 от Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ). Настоящата рецензия е изготвена в съответствие с нормативните документи – ЗРАС и ППЗРАС и Препоръките на ФС на БФ за критериите при придобиване на научни степени, съобразени с тях. Рецензирането на материалите е съгласно Заповед № РД 38-360/ 07.07.2025 год. на проф. д-р Георги Вълчев, Ректор на СУ „Св. Кл. Охридски“ за назначаване на научното жури.

Докторантът Мария Илиева Пандова е представил необходимите документи, изисквани за процедурата за вътрешна защитата на дисертационен труд, които включват: 1. Дисертация; 2. Автореферат (на български и на английски език); 3. Две публикации по темата на дисертацията; 4. Диплома за придобита бакалавърска степен (копие); 5. Диплома за придобита магистърска степен (копие); 6. Заповеди за зачисляване; 6. Удостоверение за положените изпити от индивидуалния план; 7. Протокол и становище за липса на плагиатство; 8. Справка за съответствие с минималните национални изисквания за ОНС „доктор“ за област *4. Природни науки, математика и информатика, Професионално направление 4.3. Биологически науки*, според която докторантът покрива 95 точки (от изискуеми 80); 9. Справка от системата *Авторите*; 10. Автобиография.

Общо представяне за съответствие на процедурата и докторанта с националното законодателство

Представеният комплект документи от Мария Илиева Пандова за присъждане на образователната и научна степен (ОНС) „доктор“ е в съответствие с действащите към момента ЗРАСРБ и ППРАСРБ. От приложената справка за съответствие с националните

минимални изисквания за ОНС „доктор“ за съответната научна област е видно, че кандидатката напълно отговоря на тях. **Нямам критични забележки по същество към представените документи.**

Кратки биографични данни за докторанта

Мария Илиева Пандова завършва средно-специално образование в Природо-математическа гимназия "Акад. С. П. Корольов" гр. Благоевград през 2016 г. През 2020 г. придобива ОКС *Бакалавър* по молекулярна биология, а през 2022 г. ОКС *Магистър* по Микробиология и микробиологичен контрол в Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски“. Паралелно с това през 2021 г. придобива и СДК за учителска правоспособност по биология в СУ „Св. Климент Охридски“. В периода 2022-2025 г. е редовен докторант в същата катедра. „От 2023 г. работи като първо ниво изследовател (R1) в Катедрата по обща и промишлена микробиология в СУ „Св. Климент Охридски“. Мария Илиева Пандова е представила шест научни публикации, от които две по темата на дисертацията, 12 участия в научни форуми, от които седем по темата на дисертацията, а също така и участие в шест научни проекта. Носител е на две научни награди – финалист в конкурс на фондация „Карол Знание“ и второ място на постер в 15^{-тия} Конгрес на микробиолозите в България.

Актуалност и значимост на дисертационната тема

Предложената за рецензия дисертация е насочена към по-доброто разбиране на ползите и рисковете от употребата на видовете *Enterococcus*. Нейната основна цел е характеризирани на широк набор представители с оглед установяване на биологичните им свойства, разкриващи тяхната двойствена природа – като полезни или вредни микробни агенти.

Ентерококите са повсеместно разпространени и могат да бъдат открити във вода, почва, растения и някои хранителни продукти. Те също така се считат за част от нормалната полезна стомашно-чревна микрофлора както при хората, така и при животните. Наличието на ентерококи обаче в хранителните продукти отдавна се счита за признак на лоша хигиена. От друга страна, поради тяхната ензимна и протеолитична активност, те се използват като стартери при ферментацията на различни храни и играят важна роля в развитието на органолептичните им свойства. Ентерококите могат да доведат до разваляне на преработените меса, но са важни за зреенето и вкусовите качества на някои традиционни сирена и колбаси. Поради способността им да произвеждат бактериоцини, притежаващи антимикробно действие, ентерококите се използват като защитни култури при биоконсервирането на храни. Освен това, те показват пробиотични свойства с различни полезни характеристики. През последните няколко десетилетия обаче ентерококите се очертаха като едни от най-важните бактерии в световен мащаб, основни опортюнистични агенти, причиняващи широк спектър от нозокомиални инфекции. Те са резистентни или толерантни към много антимикробни средства, а мултирезистентните ентерококи принадлежат към така наречените „терапевтично проблемни микроорганизми“. Според

СЗО, ванкомицин-резистентните представители са високоприоритетни патогени в списъка на микроорганизмите, за чието лечение е необходимо спешно разработването на нови антибиотици. Освен това, те притежават множество фактори на вирулентност.

Ето защо задълбочено изучаване на ползите и рисковете от тяхното присъствие в храната и употребата им като пробиотици е от изключителна важност и ясно мотивират избора на темата, нейната актуалност и практическо значение.

Обща характеристика на дисертационния труд

Рецензията от мен дисертационен труд е структуриран съгласно изискванията за такъв тип научни разработки. Написан е на 202 стандартни машинописни страници и съдържа следните раздели: Въведение – 2 стр.; Литературен обзор – 50 стр.; Цел и задачи – 1 стр.; Материали и методи – 15 стр.; Резултати и обсъждане – 63 стр.; Изводи – 1 стр.; Приноси – 1 стр. Включени са 39 фигури, 16 таблици и 5 приложения. В литературната справка са отразени 500 заглавия, всичките на латиница.

Дисертацията е написана на добър научен език, с ясно и стегнато изложение на информацията, което показва, че докторантката познава професионално материята. Работата е структурирана логически и всички експерименти се придружават от снимков и графичен материал, което улеснява разбирането на съдържанието. Представената литературна справка предлага един задълбочен анализ на състоянието на проблема. Докторантката се е запознала много добре с литературните данни и умело ги използва при интерпретиране на резултатите.

Оценка на съдържанието на дисертационния труд

Литературният обзор е структуриран правилно с пряко отношение към целта на дисертацията и поставените задачи. Обзорът на дисертационния труд засяга основните характеристики на представителите на род *Enterococcus* и техният потенциал да предизвикват различни клинични инфекции. Условно се разграничават две основни теми: ентерококите като причинители на вътреболнични заболявания и положителните свойства на ентерококите. В първата част докторантката представя клинични заболявания асоциирани с ентерококите; факторите, определящи вирулентния им потенциал, познатите механизми на антибиотична резистентност при тези микроорганизми, възможностите за осъществяване на хоризонтален генетичен трансфер и ролята на CRISPR системите за придобиването на антибиотична резистентност при ентерококите. Втората част е насочена към употребата на ентерококите за производството на различни храни и фуражи. Описани са подробно разнообразните БАВ, които те синтезират и какъв е положителния ефект от тях върху човешкия организъм. Предоставена е и изчерпателна информация относно приложението и регулацията на ентерококите на пазара и тяхната безопасност. Заключение на литературния обзор ясно обобщава постигнатите знания до момента и

очертава необходимостта от нов интегративен подход за изучаване на представителите на род *Enterococcus* за разрешаване на дилемата добър кандидат ли са за пробиотик или са опортюнистичен патоген.

Целта е ясно и точно формулирана, а **задачите** са три, като втора и трета задача са с четири подзадачи. Те представят логическите етапи на изследването и дават ясна представа за изследванията, които ще се провеждат, което от своя страна е предпоставка за оценка на адекватността на използваните методи. Всичките планирани задачи и подзадачи намират своето разрешение в края на разработката.

Разделът **Материали и методи** включва подробно описание на голям набор от съвременни микробиологични, биохимични, молекулни и биоинформатични подходи. Тяхното разработване и успешно прилагане е вече един безспорен успех и показва сериозната методична подготовка на докторантката, което е гаранция за добри и надеждни резултати. Мултидисциплинарният характер на изследването е позволило на докторантката да придобие широк набор от ценни методически умения. Поздравления за добре организираната и извършена лабораторна работа, която е в огромен обем и изисква много усилия и работа по реализирането на всички анализи със специфичните инструменти.

Резултати и обсъждане. В тази част на дисертацията е направено цялостно характеризирание по отношение на патогенния потенциал, генетични детерминанти, участващи в хоризонталния генен трансфер, CRISPR-локуси и CRISPR-асоциирани белтъци и пробиотичен потенциал на 72 ентерококови щама, изолирани от 7 различни екологични ниши. Дисертационния труд започва с изолирането на огромен набор представители на род *Enterococcus*, които са идентифицирани до вид посредством комбинация от различни морфологични, биохимични (и MALDI-TOF масспектрометрия) и молекулярно биологични критерии (PCR с родово- и видово- специфични праймери, 16S рДНК и целогеномно секвениране). Въз основа на проведените експерименти са получени ценни данни относно видовото разнообразие в анализиранияте хабитати – ГИТ на градинския охлюв *Cornu aspersum*, хранителни продукти и човешка кърма. На базата на секвенирането на участъка на 16S рДНК и целогеномното секвениране са проучени филогенетичните различия и еволюционната история на няколко представителя на *E. faecalis* CM4, BM5, BM12, BM15 и *E. mundtii* CA8 и CA17. Последващите изследвания са насочени към характеризирание на патогенния потенциала на изследваните ентерококови щамове. Изучени са голям набор от разнообразни детерминанти като: гените, отговорни за хемолитична активност (*cylB*), повърхностен протеин (*esp*), регулатора на стресовия белтък (*gls24*), нуклеаза (*nucl*), Mn-транспортер (*psaA*), агрегационно вещество (*agg*), гена за желатиназа (*gelE*) и гена за свързващ белтък (*ase*). Резултатите в това проучване показват, че в разпространението на генетичните детерминанти, отговорни за патогенния потенциал на изследваните представители на род *Enterococcus*, се наблюдават значителни различия, зависещи както от екологичната ниша на izolата, така и от видовата принадлежност. С Получени са данни с важен научно-фундаментален принос, които показват, че растително-

асоциираните ентерококови изолати в ГИТ на охлюва и в храните не носят гени за вирулентност, докато най-голям брой гени за вирулентност са установени в *E. faecalis* изолатите от кърма. Направен е и скрининг за наличие на фенотипна и генотипна антибиотична резистентност, което отново показва, че разпространението на гените за антибиотична резистентност е най-широко в ентерококовите популации, изолирани от кърма. При изследването на генетичните детерминанти, участващи в хоризонталния генен трансфер (агрегационни вещества, полови феромони и подвижни генетични елементи) се установява, че ентерококите с човешки и потенциално животински произход (от млечни храни) са подложени на най-голям еволюционен натиск и съответно притежават множество мобилни генетични елементи, необходими за тяхното оцеляване. Всички щамове в проведеното изследване са тествани и за наличието на CRISPR локуси и техните асоциирани CAS белтъци и е показано, че повечето детектирани CRISPR системи не са активни, което прави изследваните ентерококови щамове чувствителни към бактериофаги и способни да придобият екзогенна ДНК. Проучването завършва с характеризиране на изследваните ентерококите по отношение на антагонистичното им действие спрямо патогенни микроорганизми и оценката на потенциала им за приложение като пробиотични продукти. Важен научен и приложен принос на научния труд е изолирането на два щама *E. mundtii* CA8 и CA17 от ГИТ на *Cornu aspersum*, в чиито геноми не са установени известни към момента гени за вирулентност и не показват резистентност към тестваните антибиотици, което ги прави подходящи за употреба като пробиотици.

Направените **изводи** имат връзка с поставените цели и задачи и логически следват от представените резултати и техния анализ. В извършените изследвания могат да се очертаят както теоретични, така и оригинални приложни **приноси**, които доказват значимостта на научната разработка. Те напълно отразяват достойнствата на направените проучвания.

Личен принос на докторанта. Значимото лично участие на Мария Пандова в проведените изследвания е неоспоримо. Тя е първи автор в двете публикации, както и в 7 участия в научни форуми, свързани с дисертацията. Прогресът в изследванията на докторантката е проследяван и на докторантски семинари, организирани от катедра „Обща и промишлена микробиология“, на които Мария Пандова е представяла своите научни постижения. Това ми дава основание да считам, че представеният дисертационен труд, както и формулирането на изводите и приносите са нейна заслуга.

Автореферат. Отразва изцяло и коректно същността на дисертацията. Включва 102 страници заедно с представените таблици и фигури. Формулираните изводи и приноси съответстват на тези в дисертацията. Считам, че авторефератът отговаря на всички необходими изисквания.

Становище за значимостта и убедителността на получените резултати

Следва да се подчертае, че темата на дисертационния труд изисква многостранни и задълбочени познания и практически умения, каквито Мария Пандова определено е усвоила в периода на разработването на дисертационния си труд. Тя демонстрира добри изследователски умения за планиране на проучването и подбора на подходящите класически и съвременни методи и средства, както и за правилната интерпретация и анализ на резултатите. Те са значими, убедителни и представени по подходящ начин.

Към докторантката имам следните въпроси:

1. Кои са молекулярните механизми, лимитиращи придобиването на екзогенен ДНК?
2. Бихте ли обяснили по-подробно механизма на резистентност от феромон-индуцируеми плазмиди.
3. Какво представляват псевдогените?
4. На какво се дължи наличието на фенотипна антибиотична резистентност в част от изследваните щамове ентерококи (напр. такава срещу ампицилин или ципрофлоксацин), когато липсва генетично кодирани детерминанти за това?
5. Какво представлява CRISPR-2 локуса „сирак“ и по какво се отличава от другите CRISPR локуси?

Оценка на качеството на научните трудове, отразяващи изследванията по дисертацията

В приложената справка са представени 2 научни публикации, като и в двете докторантката е първи автор. И двете публикации, свързани с дисертационния труд, са в реферирани научни списания с импакт фактор, като едната е с IF=3.3; SJR=0.843 и Q2, а другата е с IF=4.3; SJR=0.92 и Q1 за 2025 г. Публикацията ѝ от 2024 г. дори вече е цитирана 7 пъти. По този начин Мария Пандова изпълнява изискванията за публикационна дейност, свързана с дисертационния труд. В приложената справка са посочени и 12 участия в научни форуми. Благодарение на това свое активно участие тя е успяла да запознае научната общественост с резултатите от своята научна дейност по темата на дисертацията си.

Придобита компетентност и съответствие с изискванията на образователната и научна степен „доктор“

В хода на изпълнението на експерименталната работа и оформянето на дисертационния труд докторантката Мария Илиева Пандова е придобила следните компетенции и умения:

- разширила е теоретичната си компетентност в специфична област на микробиологията;

- придобила е умения за работа с научна литература, анализирайки и обобщавайки научна информация;
- обогатила е практическите си умения, особено в частта на прилагането на съвременни микробиологични, молекулярни и биоинформатични методи и подходи;
- придобила е аналитични умения за самостоятелно оформяне и дискутиране на научни резултати, както и да прави изводи на базата на тях.

Мотивирано заключение

Рецензията от мен дисертационен труд е написан интелигентно и на високо научно ниво. Той съдържа оригинални научни и научно-приложни резултати с принос за науката и представлява научно изследване върху актуален проблем, свързан със задълбочено проучване на факторите на вирулентност, антибиотичната резистентност, генетичната структура и пробиотичния потенциал на голям набор ентерококови щамове, изолирани от различни екологични ниши. Той е лично дело на Мария Пандова, която показва солидни теоретични знания и умения за провеждане самостоятелно научно изследване. Впечатленията ми са, че тя се е изградила като изключително прецизен, ерудиран и перспективен млад изследовател. Дисертационният труд напълно отговаря на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ) и Правилника за прилагане на ЗРАСРБ. Представените резултати и публикации напълно съответстват на наукометричните изисквания за такъв труд.

Изложеното до тук ми дава основание убедено да препоръчам на уважаемите членове на Научното жури да подкрепят присъждането на научната и образователна степен „доктор” на Мария Илиева Пандова по професионално направление в област на висше образование: 4. Природни науки, професионално направление: 4.3. Биологически науки, докторска програма: Микробиология.

16.09.2025 г.

гр. София

Рецензент:

/доц. д-р Венцислава Петрова/