

СТАНОВИЩЕ

от проф. д-р Пенка Ангелова Мончева, СУ „Св. Климент Охридски”, Биологически факултет, член на научното жури

Относно: дисертационен труд, представен за защита пред научно жури, сформирано със заповед № РД 38-360/07.07.2025 г. на Ректора на Софийския университет „Св. Кл. Охридски” за присъждане на образователна и научна степен „Доктор” по професионално направление **4.3. Биологически науки (Микробиология)**.

Тема на дисертационния труд: „Ентерококите - на границата на полезното и вредното”

Автор на дисертационния труд: Мария Илиева Пандова

Научен ръководител: проф. д-р Петя Христова

1. Актуалност и значимост на дисертационната тема

Родът *Enterococcus* са млечнокисели бактерии, които се срещат предимно в чревния тракт на хора и животни. Сред ентерококите, видовете *E. faecium* и *E. faecalis* са преобладаващи в човешката стомашно-чревна система. Ентерококите участват и в процеса на ферментация на различни храни. Освен това, някои от тях се използват като пробиотици, а други притежават способност да произвеждат бактериоцини, които инхибират растежа на други конкурентни бактерии. От друга страна, някои щамове могат да носят плазмид-медирани гени за лекарствена резистентност, които да се прехвърлят към други бактериални видове, вкл. патогенни, причинявайки намалена чувствителност към най-често прилаганите антибиотици. Тези плазмид-медирани гени в ентерококите са допринесли за появата на ванкомицин-резистентни ентерококи, които са проблематични в клинична обстановка. Ентерококите се използват в пробиотици, но те могат да причинят и вътреболнични инфекции, поради което е необходима задълбочена оценка на тяхната вирулентност и на риска от разпространение на антибиотична резистентност на ниво щам.

Родът *Enterococcus* няма статут на безопасен (GRAS), нито е включен в списъка с квалифицирана презумпция за безопасност (QPS).

Въпреки че не са били докладвани инфекции, произхождащи от консумацията на храни, съдържащи вирулентни ентерококи, тези хабитати изглежда са рисков път за предаването на гени за антибиотична резистентност и вирулентност. Ето защо щамове, избрани за употреба в храни не трябва да притежават никакви гени за вирулентност и трябва да са чувствителни към клинично значими антибиотици. Прилагането на подходящ анализ на риска/ползата за всеки отделен случай, установяването на безвредността на щамовете, познаването на законодателството и регулаторните аспекти, свързани с разработването на функционални храни, са ключовите елементи за индустриите, здравния персонал и потребителите. Това ще позволи приемането на ентерококите, подобно на други млечнокисели бактерии като важни кандидати за полезни и благоприятни приложения в хранителната промишленост и биотехнология. Въз основа на посоченото по-горе, темата на разработения и представен за защита дисертационен труд е **актуална**, тъй като предоставя допълнителна информация за разбирането на двойствената природа на представителите на род *Enterococcus*, свързана както с разкриване на техните положителни свойства, така и с ограниченията, които пречат за тяхното предлагане като пробиотици.

2. Оценка на структурата на дисертационния труд

Дисертационният труд е написан на 198 стандартни А4 страници, като е спазена общоприетата схема, както следва: Въведение (2 стр.), Литературен обзор (51 стр.), Цел и задачи (1 стр.), Материали и методи (16 стр.), Резултати (64 стр.), Изводи (1 стр.), Приноси (1 стр.), Използвана литература (53 стр.) и Приложения – 5 бр. Дисертационният труд е оформен добре и е илюстриран с 39 фигури и 16 таблици.

Литературният обзор е структуриран в 4 обособени части, в които са представени общите таксономични белези на бактериите от род *Enterococcus*, информация за ентерококите като причинители на вътреболнични инфекции, информация за положителните качества на ентерококите и кратко обобщение на съдържанието на литературния обзор. Съдържанието на литературния обзор съответства на темата на дисертацията. Написан е на добър научен стил, а представената научна информация се базира на внушителните 500 литературни източници. Считаю, че макар и

информативен, обзорът надхвърля препоръчителните 25% от общия обем на дисертацията (като се изключи цитираната литература), като някои въпроси в него са разисквани и представени твърде обемно.

Целта на дисертационния труд и трите експериментални задачи (всяка с няколко подзадачи) за нейното реализиране са формулирани конкретно и са в съответствие с темата на дисертацията и поставената цел.

В раздела „Материали и методи“ са посочени източниците, от които са изолирани щамове енттерококи, използваните хранителни среди и реактиви, както и методите, използвани при провеждане на различните анализи. Приложените методи са както класически микробиологични (изолиране, култивиране и ко-култивиране, фенотипно определяне на антибиотична резистентност към антибиотици, ДНазна, желатиназна, цитолитична и антибактериална активност), така и молекулярни, базирани на PCR (за родова и видова идентификация на изолираните щамове, детекция на гени за вирулентност, на мобилни генетични елементи, на гени за антибиотична резистентност и за анализ на разпространението на CRISPR локусите и CRISPR асоциираните белтъци), секвениране на 16S рРНК, целогеномно секвениране и биоинформатична обработка на избрани шест щамове от два вида енттерококи, статистическа обработка на данни, както и други аналитични методи като MALDI-TOF MS, както и методи за определяне на физико-химични характеристики на детектираното антибактериално вещество. Използван е достатъчно богат набор от подходящо избрани и разнообразни методи, които осигуряват изпълнението на поставените задачи и реализирането на целта на дисертационния труд. Смятам, че освен солидната теоретична подготовка Мария Пандова е усвоила много и разнообразни методи и значително е надградила методичните си умения и знания, придобити в магистърската степен на обучение. Би било добре, ако използваните праймери в различните изследвания, базирани на PCR бяха описани подробно и представени на конкретните места в този раздел или в приложение, което е важно за читателите на този труд.

В раздела „Резултати“, който според мен би трябвало да се озаглави „Резултати и обсъждане/дискусия“ са представени и обсъдени получените от експерименталната работа резултати. Проведена е голям обем изследователска работа и са получени достъчно значими резултати: изолирани и идентифицирани чрез различни методи са 72 щамове от род *Enterococcus*, като е установена принадлежността им към 11 вида с преобладаване на вида *E. faecalis*, Целогеномно са секвенирани шест щамове – четири на вида *E. faecalis* и два на вида *E. mundtii*. Определени са: характеристики на енттерококите, свързани с техния патогенен потенциал (скрининг за присъствие в тях на 8 гени за вирулентност, продукция на хемолизин, продукция на желатиназа, нуклеазна активност, фенотипна антибиотична активност, скрининг на гени за антибиотична резистентност); изследвани са гени, участващи в хоризонталния генен трансфер (гени за агрегационни вещества, гени за полови феромони, мобилни генетични елементи); изследвано е наличието на CRISPR локуси и CRISPR асоциирани белтъци; характеристики с потенциал за приложение в пробиотични продукти (антимикробна активност спрямо патогенни микроорганизми, оценка на безопасността на два щамове от вида *E. mundtii* за употребата им като пробиотици). Резултатите са представени в добре оформени фигури и таблици, статистически обработени и дискутирани в светлината на известното по темата.

На базата на получените резултати и техния анализ докторантката е формулирала 9 извода. Мария Пандова е открила и приносила характер на резултатите от своите изследвания, които аз бих определила като такива с научен и научно-приложен характер. За първи път се предоставя научна информация за:

- Положителни и отрицателни характеристики на неклинични енттерококи, изолирани от различни екологични ниши в България
- CRISPR системите в енттерококови популации в България
- Мобилния генетичен елемент, отговорен за трансфера на гена *tetM*, кодиращ резистентност на енттерококите към тетрациклин в хранителни и неклинични изолати
- Изолиран е щам на вида *E. mundtii*, продуциращ бактериоцина мундтицин, който според докторанта притежава потенциал за практическо приложение

3. Оценка на съответствието между автореферата и дисертационния труд

Авторефератът е представен на 102 страници, чието съдържание отразява в пълен вид проведените научни изследвания и получените резултати. Към него са включени 5 приложения, както и списък на публикациите на Мария Пандова, свързани с дисертацията, както и участията ѝ в научни

форуми и проекти. Препратките в текста към фигурите и таблиците обаче не съответстват на тяхната номерация в автореферата, което е объркващо за читателя.

4. Публикации във връзка с дисертационния труд

Мария Пандова е представила 2 научни публикации, публикувани в реномирани научни журнари, съответно с кватили Q1 (*Antibiotics*) и Q2 (*Pathogens*), както и списък на участия в 8 национални и 3 международни научни форуми и 5 участия в научни проекти (3 национални и 2 вътрешноинституционални). Публикациите, включени за настоящата процедура са получили осем цитирания, в международни журнари с висок рейтинг (5 – Q1 и 3 Q2). Дисертантката изпълнява и надхвърля минималните национални изисквания за ОНС „доктор“ за професионално направление 4.3. Биологически науки (Микробиология)

5. Придобита компетентност и съответствие с изискванията на образователната и научна степен „Доктор“

На базата на представения дисертационен труд мога убедено да заключа, че Мария Пандова е придобила компетентност в областта на микробиологията и специфична такава по темата на дисертационния труд както в теоретично, така и в методично отношение. Усвоила и приложила е редица класически и молекулярно-генетични методи, както и биоинформатични, което ѝ позволява задълбочен анализ и интерпретация на получените резултати. Натрупала е ценен научен опит и с участието си в научни проекти. Ето защо смятам, че придобитите от нея компетентности в различни аспекти напълно съответстват и надхвърлят изискванията на ОНС „доктор“.

6. Лични впечатления от дисертанта

Имам много добри лични впечатления от Мария Пандова, освен като студент в ОКС „магистър“, но и като извеждаща практически занятия по Таксономия на микроорганизми (част Актиномиети) в МП „Микробиология и микробиологични методи за пречистване“. Тя има афинитет освен към изследователска и към преподавателска дейност.

7. Критични бележки и въпроси

Имам следните критични бележки:

- Информацията, съдържаща се в Табл. 5 би била по-пълна и точна ако за всеки шам беше включен индексът на идентификация с MALDI-TOF (въпреки, че в текста е посочена обща приблизителна стойност за всички шамове), дължината на амплифицираните фрагменти в случаите на идентификация чрез PCR с видово/родово-специфични праймери и процентът на сходство с най-близкия шам от съответния вид от базата данни при идентификацията чрез секвениране на 16 S рРНК.
- Представянето на снимки на гелове, визуализиращи очакваните ампликони, характерни за всеки шам/вид при проведената PCR с конкретните видово-специфични праймери, както и филогенетично дърво, построено на базата на секвенирането на 16 S рРНК би било допринесло за по-доброто илюстриране на получените резултати и в същото време да послужи като доказателствен материал.

Към дисертантката имам следните въпроси:

1. Бихте ли посочили какъв брой проби са анализирани от всеки посочен източник, от който са изолирани шамовете? Какъв вид кисело мляко (краве, овче, козе или др.) сте анализирали?
2. Защо се избрали шамовете да бъдат идентифицирани с три различни подходи, без обаче те да са приложени към всички шамове едновременно? Не беше ли по-добре да използвате примерно 2 подхода, но за всички шамове, за да получите потвърждение на идентификацията с повече от един метод?
3. На базата на какви критерии е направен изборът на шамовете от вида *E. faecalis* и *E. mundtii* за целогеномно секвениране. Ако целта е разкриване на филогенетичните връзки между тях, както е посочено, защо не сте включили в този анализ и шамове на *E. faecalis* и от другите източници (напр. краве сирене, кисело мляко) за получаване на по-пълна информация?
4. Разполагате ли с допълнителна информация за донора/донорите на кърма като здравен статус, начин на взимане на пробата (ръчно или с помпа), социален статус, прием на

антибиотици и пробиотици по време на кърмене и други? Такава информация би била от полза при интерпретацията на евентуален произход на ентерококите.

Заклучение

На основание на направения по-горе анализ на дисертационния труд на Мария Пандова, на нейната изследователска, публикационна и проектна дейност, както и на базата на придобитите от нея компетентности по време на докторантурата, считам че тя е изграден млад изследовател-микробиолог със задълбочени интереси в конкретната научна тематика. Представеният дисертационен труд в неговата цялост – актуалност на тематиката, обем и качество на изследванията, получени научни резултати с приносен характер и публикационна активност е в пълно съответствие с изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилника за неговото прилагане и Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в СУ Св. „Кл. Охридски“. Въз основа на посоченото ще гласувам положително за присъждане на образователната и научна степен „доктор“ по професионално направление 4.3. Биологически науки (Микробиология) на Мария Илиева Пандова.

20.09.2025 г.
София

Автор на становището:
(проф. д-р Пенка Мончева)