

# СТАНОВИЩЕ

от проф. д-р Илия Николов Илиев,

катедра „Биохимия и микробиология” при ПУ „Паисий Хилендарски” – Пловдив

**Относно:** дисертационен труд на тема „*Геномно типизиране на пробиотична микрофлора изолирана от натурални продукти*“ представен от докторант **АНИТА БОЖИДАРОВА ГЮРОВА** от катедра „ГЕНЕТИКА” към СУ „Св. Климент Охридски“ за придобиване на образователна и научна степен „ДОКТОР” по професионално направление по област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика; професионално направление 4.3 Биологически науки; научна специалност по Генетика – Бактериална генетика и молекулно клониране.

**Получени материали:** Дисертация, автореферат, списък с публикации по дисертацията, материали е електронен вариант и дисертация и автореферати на български и английски език на хартиен вариант.

Със заповед № РД 38-107/28.02.2023г. на Ректора на СУ „Св. Климент Охридски“ съм определен за член на научно жури за защита на дисертационен труд за придобиване на образователна и научна степен „Доктор” от докторант Анита Божидарова Гюрова на тема „*Геномно типизиране на пробиотична микрофлора изолирана от натурални продукти*“. Експерименталната работа по дисертационния труд е проведена в катедра «Генетика» към СУ „Св. Климент Охридски“.

## **Актуалност и значимост на темата на дисертацията**

Интестиналният тракт при човека се населява от богата и динамична бактериална екосистема, наричана чревна микробиота, която играе ключова роля в хомеостазата на гостоприемника. Множество фактори могат да повлияят на този деликатен баланс, включително генетика, възраст, антибиотици, както и фактори на околната среда, особено диета, като по този начин предизвикват нарушаване на равновесието в микробиотата (дисбиоза).

Поддържането на здравния статус при съвременния човек налага използването на нови функционални компоненти, които да контролират микробиалната популация от полезни микроорганизми в гастро-интестиналния тракт и да се използват като бариера срещу навлизането на патогенни микроорганизми. Известно е, че интересът от една страна на науката към нови пробиотични щамове микроорганизми и природни БАВ с пребиотични свойства и от друга страна на индустрията за производството на функционални и здравословни храни нараства значително през последното десетилетие. Голяма част от тях са ферментирани храни с участието на млечнокисели бактерии. От друга страна фармацевтичната индустрия интензивно разработва пробиотични, пребиотични и симбиотични препарати, които да се използват за контрол на чревната микрофлора при човека, имуномодулация, намаляване холестерола в кръвта и други показатели, свързани с риска от заболявания на сътречно-съдовата и гастроинтестиналната система.

Предлаганата дисертационна работа е по актуална тематика в областта проучване на микробиома на българското зеленото сирене, което е с потенциал да включва микроорганизми с пробиотични свойства. Освен това анализът на пробиотичния потенциал на микроорганизми от пчелни продукти може да допринесе за изследване благоприятния им ефект върху човешкото здраве и здравето на пчелите. Независимо че, има различни изследвания върху щамовете млечнокисели бактерии за производство пробиотични препарати, посоката на проведените изследвания в настоящата дисертация показват едно съвременно научно мислене по проблемите на генотипирането на пробиотични щамове. Освен това много обещаващи са изследванията върху метагеномното проучване на традиционното българско зелено сирене.

### **Анализ на дисертационния труд**

Дисертацията е оформена по стандартен за България модел, написана е на 231 стандартни машинописни страници и съдържа следните основни глави: Съдържание – 6 стр., Въведение – 3 стр., Литературен обзор – 64 стр., Цел и задачи – 2 стр., Материали и методи – 36 стр., Резултати – 40 стр., Обсъждане – 25 стр., Изводи – 2 стр., Приноси – 1 стр., Публикации, свързани с дисертацията – 1 стр., Приложение – 23 стр.; Литература – 18 стр., Литературният преглед и резултатите са удачно онагледени с 32 фигури и 17 таблици. Докторант Анита

Гюрова е използвала много голям брой литературни източници общо 452 и 6 електронни източника.

Литературният обзор е написан на 64 страници и фокусира вниманието ни върху последните научни търсения и достижения относно основните характеристики на основни родове млечно кисели бактерии (тип Firmicutes., Actinobacteria.) Представена е информация за участието на млечно киселите бактерии при ферментация на млечни и месни храни, при ферментацията на зеленчуци и при ферментацията на закваска за хляб. Продуцирането на анти-микробни метаболити (бактериоцини и пептиди) са представени обширно. Тук бих искал да отбележа, че авторката в стремежа си да представи максимално информация по проблема е включила информация, която не е конкретно по темата на дисертацията за сметка на липсваща такава относно дефинирането и класифицирането на функционалните храни и техните потенциални положителни действия върху микробиома на човека. Такава информация е необходима най-вече поради формулираната цел на изследването. Отделно бих препоръчал значително съкращаване на литературния обзор в рамките на максимум 50 страници, за да се акцентира повече на собствените изследвания и постижения. По този начин ще се спази приетото изискване по принцип за съотношениена обзор: резултати и обсъждане 1:2.

В резултат на направения литературен обзор, авторката на дисертцията ясно формулира целта на изследването - молекулярно-генетичното и геномното характеризиране на шамове микроорганизми, изолирани от функционални храни и пчелни продукти, както и изследване на микробиотата на функционалните храни и пчелните продукти с помощта на методи, основаващи се новогенерационно секвениране. Постигането на целта изисква решаването на 17 разнообразни задачи, които докторантката е формулирала спрямо основните направления на изследването.

В раздел „Материали и методи” са описани прецизно основните методи, които са прилагани при изпълнението на поставените задачи в дисертацията. Мащабността на заложения експеримент при разработването на дисертационния труд изисква прилагането на голям брой както класически, така и съвременни микробиологични, молекулчно-биологични, биохимични и биоинформатични методи, които дисертантката е усвоила. Всичко това е основание да се счита че Анита Гюрова е придобила необходимия методичен опит при извеждане на научен експеримент.

Резултатите от направените изследвания са представени детайлно в раздел „Резултати“ и допълнително коментирани в раздел „Обсъждане“. Докторантката стартира с метагеномно проучване на традиционното българско зелено сирене, произведено в с. Черни Вит. Проучването обхваща региони V3-V4 от 16S РНК гена при бактериални видове и ITS2 при гъби. Авторката установява, че преобладават микроорганизми от Firmicutes с над 50% присъствие, следвани от Actinobacteria с малко повече от 40% и на трето място са Proteobacteria с около 6%. Останалите бактериални типове са представени в незначителни количества. При допълнителните таксономични изследвания на типа Firmicutes на родово и видово ниво Гюрова е установила, че над 30% са представители на грам-положителните млечнокисели бактерии (МКБ) от родове Streptococcus, Lactobacillus и Lactococcus. Представителите на род Staphylococcus са около около 18%). По-слабо представени са МКБ от родове Leuconostoc, Weissella, Marinilactibacillus и Enterococcus. Грам-отрицателни бактерии са в незначителни количества и сред тях най-представените родове са Veillonella и Selenomonas. Авторката доказва, че българското зелено сирене има богат микробиом, който допълнително характеризира чрез изследването на неговото алфа разнообразие.

В следващия етап от изследването докторантката Анита Гюрова изследва чревния микробиом при пчели и събира колекция от 45 щамове получени, в резултат на изолиране от пчелни семейства от 15 кошера от пчелини, разположени в различни екологични ниши - гр. София, гр. Видин, с. Душанци и с. Момчиловци. Всички те се отнасят към *Enterococcus durans*. Посредством молекулярно-генетичните изследвания авторката доказва, че един и същи щам присъства в четири от шестте кошера, определен като *E. durans* и наименован EDD2.

Докторантката е проучила способността на изолирания щам *Enterococcus durans* EDD2 да продуцира бактериоцини посредством биоинформатичен анализ на геномната му последователност. С този анализ са идентифицирани два предполагаеми клъстера сходни на enterocin L50A/L50B и enterocin P. Фокусът на изследването е идентифицирането на бактериоцин-продуциращи ентерококови щамове, притежаващи потенциал да инхибират растежа на причинителя на заболяването американски гнилец, както и щамове притежаващи пробиотичен потенциал. Тринадесетте изолата демонстрират инхибиторна активност срещу *Paenibacillus larvae*.

В следващите експерименти докторантката изследва изолираните щамове за наличие на протеолитична и бактериоцинова активност, в резултат на който 90 бр. от изолатите показват бактериоцинова активност и протеолитична активност. След секвениране на гените за 16S РНК докторантката установява, че те принадлежат към: *Lactiplantibacillus plantarum*, *Enterococcus faecium*,

*Enterococcus faecalis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Levilactobacillus brevis*, *Rosenbergia*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Serratia*, *Staphylococcus equorum* и *Staphylococcus saprophyticus*. От направените изследвания става ясно, че ампликон-базираното метагеномно секвениране на проби, съдържащи комплексни микробиоти, съчетано с биоинформатичен анализ на онлайн-базирани платформи се явява удобен, ценово оправдан, надежден и бърз начин за детайлен анализ и характеризиране на ферментирани функционални храни и някои други природни продукти, притежаващи собствени микробиоми.

В резултат на проучването докторантката е формулирала 11 извода, които по принцип следват хода на изследването и решаването на задачите.

Приемам формулираните от докторантката приноси.

Най-съществени от тях са, че за първи път в България бе извършен ампликон-базиран метагеномен анализ на ферментирал млечен хранителен продукт – зелено сирене. За първи път в България са секвенирани геноми на пробиотични за пчелите щамове от р. *Enterococcus*.

### **Автореферат и публикации**

Дисертацията, независимо от обема си, е написана на ясен и стегнат научен език. Авторефератът отговаря напълно на целите, задачите и постигнатите резултати в дисертационния труд.

Резултатите от дисертацията са публикувани в 5 научни публикации, в една от които докторантката е първи автор. Всички публикации са отпечатани в реномирани научни списания. Експерименталната работа в дисертацията е част от изпълнението на два научни проекта.

### **Въпроси, забележки и препоръки**

Към докторатката имам следните въпроси:

1. Как бихте обяснили факта, че от една страна откривате голямо разнообразие на микрофлората в българското зелено сирене с преобладаващи млечнокисели бактерии, а от друга не са установени щамове с ясно изразени пробиотични щамове?
2. Как ще обясните факта за наличието на един и същ щам *E. durans EDD2* в 4 от шестте изследвани кошера?

### **Заклучение:**

**Оценката ми за дисертационния труд, автореферата, научните публикации и научните приноси на докторантката Анита Божидарова Гюрова е напълно положителна. Въпреки направените препоръки, бих искал да отбележа още веднаж достойнствата ѝ – на първо място една мащабна по размер изследователска работа, надхвърляща значително необходимия минимум за една дисертация, съдържаща огромно количество резултати, правилно интерпретирани и обобщени. Оригиналният характер на получените данни за микробиома на българското зелено сирене и изолираните бактериоцин-продуциращи щамове микроорганизми имат както научен, така и научно-приложен характер с потенциал за приложение при получаването на нови функционални храни.**

Представената дисертация напълно отговаря на изискванията на ЗРАСРБ и Правилника за неговото прилагане. Постигнатите резултати ми дават основание да предложа да бъде присъдена образователна и научна степен „доктор” на **Анита Божидарова Гюрова** по професионално направление по област на висше образование 4.Природни науки, математика и информатика; професионално направление 4.3 Биологически науки; научна специалност по Генетика – Бактериална генетика и молекулно клониране.

23.03.2023г.

Изготвил:

Пловдив

(проф. д-р Илия Илиев)