



РЕЦЕНЗИЯ

От доц. Виктория Стефанова Левтерова, д.м.,
зав.отдел „Микробиология” при НЦЗПБ, София,

На дисертационен труд представен пред научно жури, сформирано със заповед № 140/ 25.04.2019 г. на Директора на НЦЗПБ, за присъждане на образователната и научна степен „ДОКТОР” по научната специалност „Микробиология” – шифър 01.06.12. В област на висше образование 4. „Природни науки, математика и информатика”. Професионално направление 4.3. „Биологически науки”

Тема на дисертационния труд: „Коагрегация и потискане на патогенни микроорганизми от индустриални млечнокисели бактерии“

Автор на дисертационния труд: Цветелина Христова Юнгарева, докторант задочна форма на обучение към Отдел Микробиология на Националния Център по Заразни и Паразитни Болести.

Научен ръководител: проф. Жечко Панайотов Димитров, дм

Представеният ми за официална защита дисертационен труд на тема „Коагрегация и потискане на патогенни микроорганизми от индустриални млечнокисели бактерии“ на Цветелина Христова Юнгарева ми дава основание да формулирам рецензията си както следва:

Актуалност на тематиката

През последните години нараства интересът към млечнокиселите бактерии от гледна точка на медицината. Това се дължи главно на техните антагонистични свойства спрямо множество човешки патогени. Този интерес е засилен и поради ежегодното увеличаване на антибиотична резистентност на някои от патогените.

Както всички знаем пробиотиците, които навлизат все по масово като средство за балансиране на чревната флора включват избрани култури млечнокисели бактерии. Подбора им за производство на пробиотични продукти, обаче е доста труден и прицизен, поради факта, че в действителност малък процент от тях притежават полезни свойства като същевременно имат и технологичните характеристики за промишлено производство.

Връзката между чревния микробиом и човешкото здраве се оказва от съществено значение.

Знаем, че множество чревни патогени, като *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli*, *Campylobacter* и *Clostridium difficile*, могат да отключат хронични възпалителни процеси и редица заболявания на стомашно-чревния тракт.

Напоследък интерес представляват свойствата свързани с взаимодействието между млечнокиселите и патогенните бактерии, като антимикуробна активност и коагрегация. Известни са множество метаболити на млечнокиселите бактерии, като органични киселини, пептиди и бактериоцини, които проявяват антимикуробно действие в различна степен и към различни групи патогени.

Проучването на факторите, които участват в авто- и коагрегацията дава информация за механизмите по които тези процеси се извършват.

През последните години се повишава интереса към изследване механизмите на ко-агрегация с патогенни бактерии от страна на специално подбрани щамове, включително с пробиотичен потенциал.

Дисертационният труд на Цветелина Христова Юнгарева се отличава с оригинален подход и методическа подготвеност. Проучванията заложи в дисертационния труд са важни, много актуални, с приложно и икономическо значение.

Апробирани, въведени и приложени са генетични методи - Real Time PCR за определяне експресията на гени с отношение към ко-агрегацията, както и изследване на антимикуробната активност на млечнокиселите бактерии, чрез система за фенотипен микроарей.

Основната насоченост на разработката е да се проучат възможностите на млечнокиселите бактерии, използвани в млечната промишленост, да проявяват антимикуробна активност и коагрегация спрямо ентеропатогенни бактерии от видовете *E. coli*, *Salmonella* и *Shigella*, както и на *Staphylococcus* и *P. aeruginosa*. Съществена част от работата е отделена на изследване на агрегационните фактори, участващи в процеса на коагрегация при *Lactobacillus bulgaricus* и *Bifidobacterium longum*.

Така фокусирана, основната насоченост определя дисертабилността на темата и предлага възможности за оригинални приноси.

Познаване на проблема

Дисертационният труд е конструиран в традиционна форма със съответните раздели. Написан е на 163 компютърни страници и е онагледен с 18 таблици и 34 фигури. Една част от тях са включени в раздели „Литературен обзор” и „Материали и методи” и подпомагат читателя при възприемане на текста. Книгописът включва 377 литературни източника (2 на български автори и 375 международни). Висок процент от тях са след 2010 година, което подчертава още веднъж неговата актуалност. Всички те изцяло кореспондират с поставените цел и задачи.

На базата на литературните източници използвани в дисертацията, докторантката е направила задълбочен литературен **обзор** на 42 страници.

Включеният в обзора материал е доказателство, че Цветелина Юнгарева много добре познава поставения проблем. Литературният обзор е написан информативно и представя таксономични, биохимични и микробиологични характеристики на родовете *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*. Описани са устройството на клетъчната стена и повърхностните компоненти на клетката, определящи агрегацията.

Разглеждат се и пробиотичните свойства на представители на тези два рода. В него се обръща специално внимание и на процеса и механизмите на ко-агрегация, както и на влиянието на фактори върху ко-агрегационните взаимодействия. Описани са структурни и регулаторни гени, които са свързани с ко-агрегацията, на които през последните години са провеждани изследвания свързани с тяхната експресия.

В част от обзора е направен анализ на възможностите на биоинформатиката за изучаване на агрегационните фактори и процесите на ко-агрегация при бактериите.

Въз основа на този задълбочен анализ е изведена целта на настоящата дисертация, а именно да се изследва способността на избрани култури млечнокисели бактерии (*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus* и *Bifidobacterium* sp.) да взаимодействат с патогенни бактерии, като *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus* sp. и *Pseudomonas aeruginosa*, посредством коагрегация и потискане на тяхното развитие.

При така поставената цел, логично са формулирани и задачите:

1. Доказване способността на отделни щамове млечнокисели бактерии да потискат развитието на *E.coli*, *Salmonella*, *Shigella* и *Staphylococcus* sp. и *P.aeruginosa in vitro*.

2. Тестване на системата Omnilog за изследване на антимикробна активност
3. Изследване на коагрегацията на щамове *L. bulgaricus* и *Bifidobacterium* sp. с патогенни бактерии.
4. Проучване на факторите, определящи агрегацията и коагрегацията при *Bifidobacterium* sp.
5. Проучване на факторите, определящи агрегацията и коагрегацията при *L. bulgaricus*.

Разделът „Материали и методи“ е информативен и методически издържан. За реализиране на поставените задачи, както е видно от раздела, докторантката е усвоила и приложила подходящи методи - както класически микробиологични методи при изпитване антимикробната чувствителност на изследваните щамове, така и някои молекулярни, електрофоретични и биоинформатични методи, които са описани подробно в раздела. Видно е едно добро ниво и методична подготвеност, с използване на голямо разнообразие от методики.

Постигнати са важни и съществени резултати, представени и обсъдени на 71 страници в раздел „Резултати и обсъждане“. Илюстрирани са с 24 фигури и 13 таблици. Описанието на резултатите е точно и ясно и е направено на добър научен език.

Резултатите и обсъждането са представени в 5 раздела, като следват логичната последователност на поставените задачи.

В първия раздел е представено определянето на антимикробната активност на култури млечнокисели бактерии и бифидобактерии, срещу подобрени патогенни щамове. Използвани са ямково-дифузионен метод и автоматизирана система за фенотипен микроарей OmniLog. Идентифицирани и определени са конкретните щамове млечнокисели бактерии, които подтискат развитието на конкретните патогени.

Във втория раздел са представени ко-агрегативните свойства на щамовете *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* спрямо изследваните патогени. В раздела са доказани и описани ко-агрегативните способности на важни за индустрията щамове млечнокисели бактерии от колекцията на „Ел Би Булгарикум“ ЕАД.

В третия раздел са представени проучванията на повърхностните фактори, определящи ко-агрегацията при подобрени индустриални щамове *L. bulgaricus* и *B. longum*.

В четвъртия раздел се представя определянето на генната експресия на **apf** и **app** гените които имат роля в процесите на ко-агрегация. Във връзка с това е разработен real-time PCR за оценка на експресията. проектирани са PCR праймерите и са

оптимизирани условията на реакцията. Чрез този метод може да се оцени степента на експресия на гените *arp* и *apf*, които кодират агрегативните фактори в зависимост от различните условия.

Биоинформатичната обработка и анализите на получените резултати са направени в петия раздел от частта „Резултати и дискусия“. Там са описани и направените справки с базите данни на публикувани ДНК^н, както и с протеиновите бази данни (иРНК).

Докторантката умело сравнява получените ДНК секвенции от секвенационния анализ с публикувани в базата данни NCBI и прави изводи за идентичността и структурата. Чрез биоинформатична обработка със специализиран софтуер са предсказани структурни и функционални домени в двата агрегационни фактора **Apf** и **App**. Показано е че, белтъците са секреторни и нековалентно свързани с клетъчната повърхност. Те са способни на електростатично взаимодействие с отрицателно заредени повърхностни структури (Apf) и захари (App).

При анализа на резултатите от изследването на генома и на повърхностните белтъци на производствения щам *B. longum*1/2, като вероятни фактори които обуславят агрегационните способности на тази култура, се определят, протеините на сортаза-зависимите пили (повърхностно разположена трансалдолаза или еластин-свързващ белтък).

В обобщение разделът „Резултати и дискусия“ е написан компетентно, като се вижда познаването на проблема в световен мащаб. Докторантката го е илюстрирала и документирала отлично. Тя анализира и дискутира задълбочено получените резултати.

Изводите са коректно формулирани и обобщават основните акценти в работата. Дисертантката представя два научно-теритични приноса с оригинален характер и четири научно-приложни приноса с които съм напълно съгласна.

Резултатите от дисертационния труд са публикувани в 3 статии в реферирани научни списания, като една от статиите е с импакт фактор.

Данните са представени също така и на 4 научни форума, един от които е международен. Трябва да се подчертае, че в трите си публикации, Цветелина Юнгарева е първи автор, което е доказателство, че тя има личен принос и основно участие за тяхното осъществяване.

Благодарение на дисертационния труд, към досега известната съвкупност от пробиотични свойства на два важни за „Ел Би Булгарикум“ ЕАД индустриални щама, ще се добави и ново пробиотично свойство – ко-агрегация с патогенни бактерии.

В заключение, дисертационният труд на Цветелина Юнгарева отразява високо професионално ниво на извършените изследвания, той е иновативен и с научно и приложно значение. Изпълнен е на високо методично ниво, с постигнати съществени резултати и приноси в областта на промишлената микробиология. Чрез него тя се представя като изследовател, способен да разработва, изпитва и прилага в лабораторната и промишлена практика както класически микробиологични методи, така и някои молекулярни и биоинформатични методи.

Поради гореизложеното считам, че рецензираният дисертационен труд отговаря напълно на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Р. България (ЗРАСРБ), Правилника за неговото приложение и Правилника на НЦЗПБ за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“.

Давам положителната си оценка и убедено подкрепям присъждането на образователната и научна степен „Доктор“ по научна специалност Микробиология на Цветелина Юнгарева.

31.05.2019 г.

Рецензент:



доц. Виктория Левтерова, дм