

СТАНОВИЩЕ

от доц. д-р Тая Георгиева Димова, ИБИР-БАН, София
член на научно жури съгласно заповед № 2863/03.11.21г.
на Ректора на Тракийски Университет, Стара Загора

относно дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „ДОКТОР“ по научна специалност „Морфология“, Професионално направление 6.4 „Ветеринарна медицина“, Област на висше образование 6 „Аграрни науки и ветеринарна медицина“.

На свободен докторант д-р **Марияна Пепова Стратева**, катедра „Ветеринарна анатомия, хистология и ембриология“, Ветеринарно-медицински факултет, Тракийски Университет, Стара Загора.

Тема на дисертационния труд: Хистологично, физикохимично и микробиологично изследване на мускулатура от прясна и замразена шаран (*Cyprinus carpio*) и дългопатърства (*Oncorhynchus mykiss*).
Научен ръководител: проф. д-р **Георги Пенчев Георгиев, DVM, PhD**.

Актуалност и значимост на тематиката

Актуалността на тематиката се определя от факта, че консумацията на риба силно се увеличава през последните години и въпреки разнообразието от аквакултури, производството на аквакултури в ЕС е концентрирано до голяма степен върху няколко вида, като най-важните са миди, сьомга, ципура, дългопатърства, лаврак, стриди и шаран. Прясната риба е изключително деликатна храна, податлива на разваляне при преработка, транспортиране, опаковане и съхранение. Въпреки че замразяването е признато за ефективен метод за запазване на вкусовите качества на рибата, потребители предпочитат прясна риба и предпочитанията му за прясна риба се основават основно на сензорна характеристика. Докторантката ясно подчертава, че разваляна на замразени/размразени за прясна риби е измамна практика, което изисква въвеждането на стабилни аналитични процедури за оценка на свежестта. Методите, използвани за разграничаване на прясна от замразени/размразени риби, могат да бъдат категоризирани в следните категории: органолептични, хистологични, ензимни, физични, физиологични и биохимични. В представеният ми за рецензиране дисертационен труд са анализирани хистологични, физикохимични и микробиологични промени при едно- или двукратно замразени шаран и дългопатърства в сравнение с прясна такава с оглед осигуряване на надежден метод за разграничаване на замразена/размразена от прясна риба и осигуряване на безопасна консумация.

Характеристика и оценка на дисертационния труд

Дисертационният труд е написан на 190 стандартни страници, вкл. литературна справка от 275 източника, 8 от които на кирилица и 267 на латиница и е ограден с 92 фигури и 24 таблици. Обичайните раздели са под формата на отделни глави, съответно пропорционално, а именно Литературен обзор 26 стр., Материали и методи 9 стр., Резултати 83 стр. и Дискусия 31 стр.

Разделът „Литературен обзор“ е информативен и подробен и запознава читателя, освен с разработките на други автори по темата, и с актуални европейски нормативни документи, свързани с менажиране производството и обработката на риба. Обръща се специално внимание на нормалната хистоструктура на мускулатурата на прясна риба като е направено детайлно описание на миофибрилите, което според мен епроводено със схема би улеснило доста читател, ако той не е специалист в материята (стр. 12-15). Както се вижда от обзора хистологичните промени при прясна и замразена/размразена риба при различни режими на замразяване и при различни видове риби са обект на доста проучвания от 1982 до днес, последното показано проучване е от 2019, което още веднъж показва, че тематиката е актуална. Авторката акцентира върху най-нови и модерни техники за замразяване като фаворизира замразяване под налягане, който метод запазва микроструктурата в по-голяма степен в сравнение с конвенционалните методи на замразяване. Литературният обзор завършва с критично обобщение и докторантката логично мотивира целта на собственото си научно изследване, а именно „влиянието на еднократно и двукратно замразяване и последващо размразяване върху хистоструктурата, физикохимичните и микробиологичните показатели на мускулатура на шаран“.

(*Syngnathus tylerii*) и дългова пъстърва (*Oncorhynchus mykiss*)" с оглед предоставяне на информация, която да улесни ползвателя при разграничаване на прясна от замразена и размразена риба. Формулирани са 8 задачи, адекватни на поставената цел, които според мен биха могли да се обединят в 4. Приятно впечатление прави добрия и терминологично издържан изказ на докторантката.

В раздел „Материали и методи“ има добър набор от релевантни за целта и задачите методи като микроморфометрични, хистологични, хистохимични, физикохимични и микробиологични, позволяващи широкообхватен поглед към проблема. Подходите на изследване и методите са подобрени прецизно, така че да осигурят изпълнението на заложените задачи. Материалите и методите са описани изчерпателно с малки изключения. При описание на Експеримент 1 не е обяснено детайлно по колко от общо 14 риби са включени в експерименталните групи т.е. подложени на замразяване и размразяване еднократно или двукратно при посочените режими на замразяване и дни на съхранение (-10°C , -18°C и -27°C за 15 дни и общо 30 дни). По отношение на определяне на физикохимичните показатели е въведено понятието „размесена средна проба“ без да е описано какво представлява тази проба. В същото време е написано, че са изследвани 144 проби от шаран и 144 проби от дългова пъстърва, но не става ясно това индивидуални проби ли са или т.нар. размесени средни проби. По отношение на микробиологичното изследване – изследвани са 36 проби от мускулатура на шарана и общо 36 проби от мускулатура на дългова пъстърва, но не е уточнено от колко риби са взети тези проби, от едно и също място ли са взимани или са пул от проби от различно място и различни риби. По отношение на статистическите анализи бих препоръчала гореше на докторантката при бъдещи подобни анализи, които налагат сравнения на повече от две групи да прилага ANOVA за оценка на достоверни разлики.

Задълбочените изследвания в този дисертационен труд са описани в раздел Резултати и показват следното: 1) замразяването и последващото съхранение волят до необратими промени в хистоструктурата на месото на шарана и дълговата пъстърва; 2) установяват се промени и в някои от химичните показатели като водно съдържание и респект, но не в количеството сувор протеин и липиди специално при шарана, докато всички тези показатели търпят промени в резултат на замразяване/размразяване при дълговата пъстърва и 3) не се отчитат промени в присъствието на ентеробактерии преди и след замразяване/размразяване и последващо съхранение за 30 дни. Данните в раздел „Резултати“ са описани с достатъчно по-обем качествени снимки, таблици и графики. Използван е богат набор от хистологични препарати с различно качество в подкрепа на получените резултати като конвенционалното оцветяване с хематоксилин/еозин е дублирано и с допълнителни селективни хистологични техники за оцветяване на колагенови фибри, еластинови влакна и мускулна тъкан. Тъй като целта на изследванията е да се установят промени (хистологични, физикохимични и микробиологични) в резултат на замразяване/размразяване за мен по-логично би било в раздел Резултати описанието да е в сравнителен аспект – например промени при опитни групи замразени/размразени (шаран или дългова пъстърва) спрямо контролната група прясни риби. Комбинирането на хистологичните снимки в няколко табла, така че на едно табло да присъстват снимки от опитни и контролна групи би помогнало на читателя бързо и без затруднение да отчете промените в хистоструктурата в резултат на замразяване/размразяване. Това би оптимизирало и броя на фигурите. Докторантката описва получените резултати при всяка група поотделно и поставя всяка снимка като отделна фигура, което е причина за ненужно голям брой фигури. Това обаче е въпрос на стил и право на избор на докторанта и аз го приемам и уважавам. Имат малки забележки, които по никакъв начин не намаляват стойността на дисертационния труд и са както следва: липсва бър скала на снимките или информация за използваното увеличение в легендата на фигурите, за мое успокоение обаче, в статиите, където този материал от дисертацията е публикуван снимките са със скала за оценка на увеличението; фигури 87, 88 и таблици 1 и 2 могат да се заместят от една графика или една таблица, по същия начин може да се поставят с фигури 89, 90 и таблици 3 и 4; не е ясно стойностите на параметрите на Фигури 87, 88, 89, 90, 91 и 92 на репрезентативен образец ли са или на селектиран, тъй като не са представени като средни стойности със стандартно отклонение или стандартна грешка.

В раздел Дискусия коректно са отразени получените данни от други автори, работили по темата и на фона на тях критично биват анализирани собствените резултати. Приведени са изключително

много и разнообразни данни в сравнителен аспект при различни видове риби и други морски организми и на този фон докторантката е успяла да отличи своите потвърдителни резултати. Не виждам обаче подчертаването на собствените оригинални резултати в дискусията, те са видими едва в раздел Приноси. Авторката е посветила голяма част от изследванията си на сравнения на морфометрични характеристики и физикохимични показатели между тръбна и коремна мускулатура при прясна шаран, при еднократно замразен шаран и при двукратно замразен шаран (Таблицы 1, 5, 7, 9, 11, 13). По същият начин са направени сравнения на морфометрични характеристики и физикохимични показатели между тръбна и коремна мускулатура при прясна дъгова пъстърва, при еднократно замразена дъгова пъстърва и при двукратно замразена дъгова пъстърва (Таблицы 3, 15, 17, 19, 21, 23). Тези сравнения нямат пряко отношение към поставената цел и задачи в дисертационният труд, но вероятно носят допълнителна полезна информация, която обаче не е дискутирана надлежно. Д-р Стратева се е сричала подробно на настоящите методи за откриване на патогени в хране, било чрез култивиране и биохимични тестове, или чрез използване на различни ДНК-базирани анализи, като тези методи са времеемки и това е недостатък на повечето от тях. Ако цялата работа в бъдеще е и същата посока бих си позволила да ѝ препоръчам да обърне внимание на съвременни и бързи методи като MALDI-TOF-MS, чрез който за много кратко време (около 2 часа) може да се идентифицира видоно патоген от една колония. Този метод се налага бързо и заради виските разходи за реагенти, което е съществена полза в методологията, свързана с безопасност на храните.

Наведени са 12 извода, които са ясни и точни без излишни предположения. Изводи 5 и 6 биха могли да се обединят, като 7 и 8. Обособена е отделна глава с 5 потвърдителни и 3 оригинални приноси на дисертационния труд, които са ясно дефинирани.

Авторрефератът правилно отразява основните резултати на дисертационния труд и е оформен адекватно на 76 страници.

Основните резултати са публикувани в 3 статии, 2 от тях са в реферирани списания със Scopus SJR – 0,161 и 0,164. Похаално е, че в трите статии докторантката е първи автор. Макар и излезли в последните две години по тях вече се установяват цитирания. Посочен е един доклад с резултати от дисертацията, представен на български научен форум с международно участие.

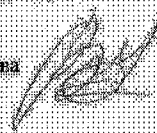
Наукометричните показатели на докторантката удовлетворяват минималните национални изисквания за такъв научен труд като са изпълнени и допълнителните изисквания в Правилника на ТрУ.

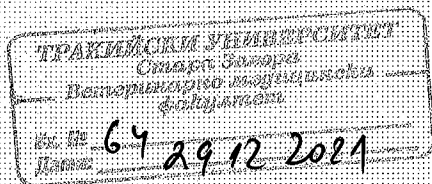
Имам следните въпроси по дисертационния труд към докторантката: 1. Има ли нормативен документ, дефиниращ мясната на прясна със замразена/размразена риба като измама и наказателна отговорност за това? 2. Има ли някаква по-специална причина биохимичните и микробиологичните показатели да бъдат определени само при шарани с тегло 1500g, но не и при шарани с тегло 500g? 3. Защо при шарани с тегло 500g и 1500g са приложени различни режими на замразяване и размразяване (вкл. 1 и 1вкл. 2).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ: Дисертационният труд на докторант д-р Марияна Пепова Стратева е изработен и представен професионално и с необходимата научна компетентност върху тематиката. Този научен труд отговаря на изискванията за придобиване на образователна и научна степен „Доктор“, заложили в Закона за развитие на академичния състав в РБ, Правилника за неговото приложение и Правилника на ТрУ. Давам положителна оценка и препоръчвам на уважаваните членове на Научното жури да вземат решение за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“ по научната специалност „Морфология“, Професионално направление „Ветеринарна медицина“ на д-р Марияна Пепова Стратева.

25.12.2021 г.

Доц. д-р Така Димова





OPINION

by assoc. Prof. Dr. Tanya Georgieva Dinova, IBIR-BAS, Sofia

a member of scientific jury according to order №2789 / 23.10.2020 of the Rector of the Trakia University, Stara Zagora

on the dissertation for awarding the educational and scientific degree "DOCTOR" in the scientific specialty "Morphology", Professional field 6.4. "Veterinary Medicine", Field of Higher Education 6. Agricultural Sciences and Veterinary Medicine".

of PhD student **Dr. Mariyana Pepova Strateva**, Department of Veterinary Anatomy, Histology and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, Trakia University, Stara Zagora

Dissertation title: HISTOLOGICAL, PHYSICOCHEMICAL, AND MICROBIOLOGICAL INVESTIGATION OF FRESH AND FROZEN CARP (*CYPRINUS CARPIO*) AND RAINBOW TROUT (*ONCORHYNCHUS MYKISS*) MUSCLES

Supervisor: Prof. Dr. Georgi Penchev Georgiev, DVM, PhD

Relevance and significance of the topic

The relevance of the topic is determined by the fact that fish consumption has increased sharply in the recent years and despite the diversity of aquaculture, EU aquaculture production is largely concentrated on several species, the most important being mussels, salmon, brook, rainbow trout, trout, sea bass, oysters and carp. Fresh fish is an extremely delicate food, susceptible to spoilage during processing, transportation, packaging and storage. Although freezing is recognized as an effective method of preserving the taste of the fish, the consumer prefers fresh fish and his preference for fresh fish is based mainly on sensory characteristics. The PhD student Dr. Strateva clearly emphasizes that the exchange of frozen/thawed for fresh fish is a fraudulent practice, which requires the introduction of robust analytical procedures to assess the freshness. The methods used to distinguish fresh from frozen/thawed fish can be categorized as follows: organoleptic, histological, enzymatic, physical and biochemical. The dissertation presented for review analyzes histological, physicochemical and microbiological changes in single- or double-frozen carp and rainbow trout compared to fresh ones in order to provide a reliable method for distinguishing frozen/thawed from fresh fish and thus, ensure safe consumption.

Characteristics and evaluation of the dissertation

The dissertation is written on 190 standard pages, incl. literature reference from 275 sources, 8 of which in Cyrillic and 267 in Latin and is illustrated with 92 figures and 24 tables. The usual sections are in the form of separate chapters, in relatively proportional volumes, namely Literary Review 26 pages, Materials and Methods 9 pages, Results 83 pages and Discussion 31 pages.

The section "Literary Review" is informative and detailed and familiarize the reader, in addition to the works of other authors on the topic, and current European regulations related to the management of fish production and processing. Special attention is paid to the normal histostructure of the muscles of fresh fish by making a detailed description of myofibrils, which in my opinion, accompanied by a scheme would make it much easier for the reader if he/she is not an expert in the subject (pp. 12-15). As can be seen from the review, the histological changes in fresh and frozen/thawed fish under different freezing regimes and in different fish species have been the subject of many studies from 1983 to the present; the last study shown is from 2019. The

author focuses on the latest and most modern freezing techniques by favoring freezing under pressure, which method preserves the microstructure to a greater extent than conventional freezing methods. The literature review concludes with a brief summary and the PhD student logically motivates the purpose of her own research, namely the impact of single and double freezing and subsequent thawing on the microstructure, physicochemical and microbiological parameters of carp (*Cyprinus carpio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in order to provide information to facilitate the user in distinguishing between fresh and frozen/thawed fish. Eight tasks have been formulated, adequate to the set goal, which in my opinion could easily be combined into 4. The good and terminologically sound utterance of the student makes a pleasant impression.

In the section "Materials and methods" there is a good set of relevant for the purpose and tasks methods such as micromorphometric, histological, histochemical, physicochemical and microbiological, allowing a comprehensive view of the problem. The research approaches and methods are carefully selected so as to ensure the fulfillment of the set tasks. The materials and methods are described in detail with few exceptions. In the description of Experiment 1, it is not explained in detail how many of the 14 fish are included in the experimental groups, i.e. subjected to freezing and thawing once or twice at the specified freezing regimes and storage days (-10 °C, -18 °C and -27 °C for 15 days and a total of 30 days). Regarding the determination of physicochemical parameters, the term "mixed average sample" has been introduced without describing what this sample is. At the same time, it is written that 144 samples of carp and 144 samples of rainbow trout were tested, but it is not clear whether these are individual samples or the so-called mixed average samples. Regarding the microbiological study - 36 samples of carp musculature and a total of 36 samples of rainbow trout musculature were tested, but it is not specified from how many fish these samples were taken, whether they were taken from the same place or a pool of samples from different place and different fish. Regarding statistical analyzes, I would strongly recommend Dr Strateva in future similar analyzes, which require a comparison of more than two groups, to apply ANOVA in order to assess significant differences.

The in-depth research in this dissertation is described in the Results section and shows the following: 1) freezing and subsequent storage lead to irreversible changes in the histological structure of carp and rainbow trout meat; 2) changes are found in some of the chemical indicators such as water content and ash, but not in the amount of crude protein and lipids especially in carp, while all these indicators change as a result of freezing/thawing of rainbow trout and 3) are not reported changes in the presence of *Enterobacteria* before and after freezing/thawing and subsequent storage for 30 days. The data in the "Results" section are illustrated with a sufficient number of good-quality photos. A wide range of histological preparations of excellent quality was used to support the results obtained, as conventional hematoxylin/eosin staining was duplicated with additional selective histological techniques for staining of collagen fibers, elastin fibers and muscle tissue. Since the aim of the research is to identify changes (histological, physicochemical and microbiological) as a result of freezing/thawing, it would be more logical for me if the results are described in comparative manner - for example, changes in experimental groups frozen/thawed carp or rainbow trout, compared to the control groups of fresh fish. Combining histological images in several plates so that photos from experimental and control groups are presented on the same plate would help the reader to quickly and easily accounts for changes in histological structure as a result of freezing/thawing. This would also optimize the number of figures. The student describes the results obtained for each group separately and places each photo as a separate figure, which is a reason for an unnecessarily large number of figures. However, this is a matter of style that I

accept and respect. I have small remarks that do not reduce the value of the dissertation in any way and are as follows: there is no bar scale in the photos or information about the used magnification in the legend of the figures, but for my reassurance, in articles where this dissertation material is published photos have a scale for estimating the magnification. Figures 87, 88 and Tables 1 and 2 may be replaced by one graph or one table, the same can be done with Figures 89, 90 and Tables 3 and 4; it is not clear whether the values of the parameters in Figures 87, 88, 89, 90, 91 and 92 are of a representative or selected sample, as they are not presented as mean values with standard deviation or standard error.

The Discussion section correctly reflects the data received from other authors who have worked on the topic and against the background of them their own results are critically analyzed. Extremely many and varied data are presented in a comparative aspect in different species of fish and other marine organisms, and against this background the PhD student was able to distinguish her confirmatory results. However, I do not see the focus on her original results in the discussion, these are only visible in the Contributions section. The author has devoted much of her research to comparisons of morphometric characteristics and physicochemical parameters between back and abdominal muscles in fresh carp, in once frozen carp and in twice frozen carp (Tables 1, 5, 7, 9, 11, 13). In the same way, comparisons of morphometric characteristics and physicochemical parameters between back and abdominal muscles were made in fresh rainbow trout, in once frozen rainbow trout and in twice frozen rainbow trout (Tables 3, 15, 17, 19, 21, 23). These comparisons are not directly related to the goal and objectives of the dissertation, but probably provide additional useful information, which, however, is not properly discussed. Dr. Strateva has focused in detail on current methods for detecting pathogens in food, either by cultivation and biochemical tests, or by use of various DNA-based assays, these methods are time-consuming and this is a disadvantage of most of them. If her future work is going to be in the same direction, I would like to recommend her to pay attention to modern and fast methods such as MALDI-TOF-MS, which can identify a certain pathogen from one colony in a very short time (about 2 hours). This method is fast and due to the low cost of reagents, which is a significant benefit in the methodology related to food safety.

There are 12 conclusions that are clear and accurate without unnecessary assumptions. Conclusions 5 and 6 could be combined, such as 7 and 8. There is a separate chapter with 5 confirmatory and 3 original contributions of the dissertation, which are clearly defined.

The Avtoreferat booklet (Abstract) correctly reflects the main results of the dissertation and is adequately formatted on 76 pages.

The main results are published in 3 articles, 2 of them are in peer-reviewed journals with Scopus SJR - 0.161 and 0.164. It is commendable that in all three articles the PhD student is the first author. Although the articles have been published in the last two years, they are already being cited. A report with the results of the dissertation has been presented at a Bulgarian scientific forum with international participation.

The scientific metric data indicators of the PhD student satisfy the minimum national requirements for such type of scientific work and the additional requirements in the Rules of the University are met as well.

I have the following questions: 1. Is there a document defining the replacement of fresh with frozen/thawed fish as fraud and criminal liability for it? 2. Is there any special reason for the biochemical and microbiological parameters to be determined only in carp weighing 1500 g, but not in carp weighing 500 g? 3. Why different modes of freezing and thawing are applied to carp weighing 500g and 1500g (Exp. 1 and Exp. 2).

CONCLUSION: The dissertation of PhD student Dr. Mariyana Pepova Strateva is performed and presented professionally and with the necessary scientific competence on the topic. This scientific work meets the requirements for obtaining the educational and scientific degree "Doctor", set in the Law for development of the academic staff in the Republic of Bulgaria, the Regulations for its application and the Regulations of Trakia University. I confidently give a positive assessment and recommend to the members of the Scientific Jury to decide to award the educational and scientific degree "Doctor" in the scientific specialty "Morphology" to Dr. Mariyana Pepova Strateva.

25.12.2021 г.

Assoc. prof. Dr. Tanya Dimova

