

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационния труд „Биоразнообразие и пробиотичен потенциал на млечнокисели бактерии от различни екологични ниши”
за придобиване на научната степен „Доктор на науките”
с автор доц. д-р Светла Трифонова Данова
от проф. д-р Райчо Димков – Биологически факултет на СУ „Св. Кл. Охридски”

Въпросната докторска дисертация е била предмет на обсъждане от Научния семинар по Обща микробиология на Института по микробиология „Академик Стефан Ангелов” в заседанието му от 15.01.2015 г. Настоящата рецензия е изготвена в съответствие с изискванията на Правилника на Института от м. юли 2012 г. и на по-висшата нормативна документация, свързана със ЗРАС.

1. Обща характеристика на дисертационния труд и профил на разработваната тематика

Дисертацията е съсредоточена едновременно върху два проблема, разглеждани в паралел: единият е общобиологичен и се отнася до микробното биоразнообразие; вторият е с конкретен характер и касае пробиотичните свойства и активни метаболити на млечнокиселите бактерии. Двата аспекта са органично взаимосвързани, тъй като пробиотичният потенциал на лактобацилите в много голяма степен преопределя тяхното биоразнообразие. Този въпрос е имплицитно обвързан и с актуалността на избраната проблематика, понеже към научно-технологичната и производствената листа на пробиотиците непрестанно се прибавят и утвърждават нови названия.

На свой ред актуалността на темата допринася за иновативността и оригиналността на получените резултати, още повече, че обект на разработката са български щамове и български хранителни продукти. Тези няколко изходни и/или опорни точки (преход от общото към частното, актуалност, иновативност) достатъчно ясно профила на разработката.

Що се отнася до общата структура на рецензирания научен труд – експерименталната, т.е. основната част на дисертацията е изложена в 4 глави като тя е предшествана от стандартните за такива случаи Литературен обзор и раздел „Материали и методи”. Всяка от четирите глави завършва със заключителна дискусия, в която се обобщават отделните насоки на изследването, подготвяйки поэтапно читателя за изводите и приносите. Впрочем, в самия край на дисертацията, под формата на резюме, е вмъкнато едно обобщаващо заключение, осветляващо философията на изследването. Този експериментален дял заема 225 стр., което е 65 % от книжния обем. Тук се включва и изобилният илюстративен материал, оформен като научна документалистика от близо 190 единици (фигури, снимки и таблици).

Предхождащият тази част литературен обзор е със собствена инфраструктура . Състои се от три раздела, които тематично кореспондират на хронологията на изложението по-нататък, както и на експерименталната логика в раздела „Резултати и обсъждане”. Това е доказателство за кохерентността и органичната вътрешна обвързаност на целия текст в книжното тяло. Обзорът отговаря на въпроса защо именно млечнокиселите бактерии са във фокуса на разработката. В подкрепа на направената по-горе констатация за актуалността

на избраната проблематика е „разрезът“ на цитираната в обзора литература според годината на поява на литературния източник.

Така например, от цитираните 789 публикации над 300, т.е. 40 % , са излезли от печат през периода 2005 – 2013 г. Реферирани са, следователно, 10-те последни години, което гарантира актуална и неостаряла научна информация по разработвания проблем. Акцентувано е върху функционалната характеристика на млечнокиселите бактерии и на техните метаболити, преди всичко – пробиотиците. Паралелно е проследявана и екологичната компонента на проблема – биотопи, екологични ниши, биоразнообразие, биотични взаимоотношения в биоценозите и пр. Ценна информация е систематизирана в табл.11 (на стр.50 – 51), която по същество представлява един кратък компендиум за млечнокиселите изолати. Оправдана е според мен идеята в началото на обзора да се представи списък на научно-методични и обзорни статии (с автор и съавтор С.Данова), имащи тематично отношение към дисертационния труд. Този факт не само доказва съпричастността на автора към проблематиката, но и свидетелства, че д-р Данова е реален участник в нея отпреди достатъчно много години.

2. Методическа основа и съдържателна същност на дисертацията

Преценката на труда откъм тези две страни (т.е. методи и резултати) тръгва от необходимостта за осмисляне на целеполагането, на заложените цели и задачи. Целта е изчерпателно изложена по начин, който дешифрира заглавието на дисертационния труд. От формулираната цел логично и по естествен път произтичат 5 основни задачи и 15 под-задачи, подредени по изискванията на есперименталната и биохимична хронология. Според присъщата си природа те могат да се отнесат към две групи: а/ изолиране и колекциониране на млечнокисели бактерии, т.е. на конкретните биологични обекти, подлежащи на по-нататъшно изследване; б/ снемане на биологичните и технологични характеристики на тези обекти, вкл. и на техния пробиотичен потенциал като функция от изходния биотоп.

При прочита и оценката на следващия раздел - „Материали и методи“, изложен върху 28 стр., съм повлиян от убеждението, че ако за образователно-научната степен „Доктор“ (т.нар. малки дисертации) е важно да се усвоят нови и надеждни методи за изследване, то сега – при големите докторати – са нужни съпоставителен анализ и обобщение. С други думи, в дисертационен труд за „Доктор на науките“ следва да са налице не само рецептура и протокол, но и интегрален обзор върху методологичния инструментариум, който е препоръчителен (ако не – и задължителен?) за постигането на заложените цели и задачи. Положителното в случая е, че авторката покрива това изискване. Синтезирано, в стегнат стил, само в рамките на 8 % от общия обем, д-р Данова успява в описанието си да покрие целия спектър – като се почне от рутинния микробиологичен анализ, мине се през изолиране на ДНК, през PCR-, хибридизационни, рестриктазни и газ-хроматографски анализи, през електрофореза, ензимни активности и сканираща електронна микроскопия, за да се стигне накрая до компютърни и статистически анализи.

Заслужава специално да се подчертае комбинираното използване на метагеномния и на и на дескриминативния PCR – анализите (вкл. и в мултиплекс – вариант) за максимално коректно отдиференциране и идентифициране на новоизолираните щамове с висока степен на подобие

помежду си. В своята цялост подобен арсенал от тестове, методи и подходи внушава необходимата доза доверие в изложените след това резултати.

Задавам си въпроса дали след неголяма преработка, с цената на известно разширение в детайлите в чисто технически план този раздел не би могъл самостоятелно да послужи като учебно пособие и / или методическо ръководство за изолиране, култивиране и за охарактеризиране на млечнокисели бактерии – както фенотипно, така и молекулярно-генетично.

И така, стигаме до следващия раздел, а именно – „Резултати и обсъждане“, където очаквано е концентрирано основното ядро на дисертационния труд на д-р Данова. Съдържанието му, както вече споменах, е разгънато в четири глави, които тематично са подредени според характерната за природните науки иерархия – в посока от проблема за биоразнообразието и хабитатите към биохимичните механизми и технологичните алгоритми. Както при добрите произведения (били те художествени или научни), тук произволни размествания не са възможни. Глава четвърта, примерно, не може да бъде поставена преди глава трета, т.е. имаме работа с една конструкция, подредена и хронологично, и логично.

Глава 1 е посветена на различните аспекти на биоразнообразието, наблюдавано при млечнокиселите бактерии. От гледна точка на техниката на работа и на интерпретация на резултатите в тази глава са преплетени различни елементи от молекулярната екология и съвременната таксономия. Авторката търси (според мен – успешно) отговор на въпроса как разнообразието от множество регионални по произход продукти кореспондира с богатото разнообразие на млечнокиселата микробиота и с целия спектър от органолептични характеристики на млечните продукти. Изолирани са и са генотипирани над 150 оригинални щамове, имащи отношение към хранителните технологии, по-точно – към млечните храни. Същевременно обаче още оттук е заложена и втора, паралелна линия на изследване, насочена към лактобацилните микробоценози на урогениталния тракт, в размер на 50 изолата. Това обстоятелство по-нататък разкрива шанс и за медико-биологични интерпретации и приложения, т.е. разширява фронта на работа – нещо, което е напълно оправдано за голяма дисертация.

Отделно от тези два източника на микробиален ресурс е работено още с 86 изолата от други ферментационни продукти. Сумарно това прави изследователски обем от близо 300 изолата, от които са изолирани и идентифицирани над 200 лактобацилни щамове. Тези числа представляват количествено измерение за реално свършената работа в лабораторни условия. Изобщо, получените резултати разкриват неочаквано богато разнообразие на лактобацилната микрофлора, но разкриването очевидно е следствие от надграждането на класическия методически инструментариум с нова изследователска техника, което бе отбелязано в предишния раздел на рецензията.

Обаче това, което е най-запомнящо се, на фона на повторно връщане към вече коментирания раздел „Материали и методи“, е обстоятелството, че молекулярната идентификация на новоизолираните щамове де факто е молекулярно охарактеризиране на съответните екологични ниши. Ето как изучаването на биоразнообразието (едно типично екологично понятие) осъществява синтеза между микробиологията, биохимичната генетика и молекулярната екология.

Глава 2 се занимава с лактобацилната активност срещу бактерии, гъби и вируси. Ключови моменти в такъв род изследвания са, първо, намирането на подходящи тест-микроорганизми при *in vitro* условия и, второ, конструирането на релевантни моделни системи за верификация на антимикробната активност. С цел по-дълбокото навлизане в механизмите на антагонистичните взаимоотношения са проведени разгънати експерименти за определяне природата на синтезираните от млечнокиселите бактерии биологично активни вещества. По такъв начин се осветляват и идентифицират материалните носители на феномена.

Впрочем, това е една от най-трудоемките и времеемки задачи. То не е случайно, тъй като се касае за диверсификация на прицелните точки – веднаж в посока към хранителните технологии и втори път – към клиничната и терепевтична практика от урогенитално естество. Тук е формулирано и твърде важното за практиката наблюдение, а именно, че липсва корелация между произход и спектър на активност – факт, който прави неизбежен скрининга за всеки отделно взет изолат. Между Впрочем, авторката е поставила акцента върху антигъбичната активност на българските щамове лактобацили. Преценено е, че само охарактеризирането на спектъра не е достатъчен индикатор и се отива по-нататък – към разкриване и описание на съответните активни метаболити и на тяхната термоустойчивост. Това е от практическо значение с оглед използването на определени лактобацили в качеството им на биопротективни култури за естествена защита на млечните продукти.

Другият възлов проблем (освен биоразнообразието), който е вербално фиксиран в заглавието на дисертационния труд, това е проблемът за пробиотичния потенциал на млечнокиселите бактерии. Тази материя е разработена пространно в глава 3 на раздела „Резултати и обсъждане“. Понеже в случая се касае за количествено измерими параметри, комплексната оценка на пробиотичния потенциал е съобразена с критериите и препоръките на съответните международни институции – WHO и EFSA.

Транзитната толерантност и преживяемост на млечнокиселите бактерии по протежение на гастроинтестиналния тракт, а така също и физиологичните процеси на растеж и развитие, са изследвани като функция от определени физико-химични параметри – рН на средата, третиране с пепсин и жлъчни соли в различни концентрации, стомашен и чревен сок. В резултат са построени и верифицирани няколко динамични модели на взаимодействие между млечнокиселите бактерии и симулирането на естествена околна среда.

Ценна информация е докладвана и относно адхезионния капацитет на лактобацилите – един специфичен фактор, от който директно зависи колонизацията на гастроинтестиналния тракт и на урогениталните пътища. Всъщност, охарактеризирани са адхезионно-повърхностните извънклетъчни структури с преобладаваща белтъчна природа. Именно те в най-голяма степен предопределят преживяемостта и работоспособността на лактобацилите като биоконсерванти. Данните в този случай не са само констативни, а са обвързани и разтълкувани заедно с генетичните детерминанти на явлението – нещо, което забележимо повишава тяхната научна стойност.

Важен и актуален акцент при представянето на кандидат – пробиотичните щамове е доказването и определянето на техните имуномодулиращи свойства. Казано по-конкретно, проследена е индукцията и секрецията на два сигнални пептида. Този факт на свой ред е свързан с протективния и терапевтичен потенциал на лактобацилите в качеството им на

възможни имуномодулатори. Тук отново млечнокиселите бактерии, благодарение на многопластовата си природа, влизат в ролята на „пресечна точка“ между нутритивното и медико-биологичното начало.

Обобщаващо изразено, в глава 3 от дисертацията става въпрос за комплексно изследване на лактобацилите от български произход с различни екологични ниши, целящо в крайна сметка да се докаже и определи пригодността им да влязат те в ролята на продуценти на пробиотици. Във връзка с това е разгледан активният синтез на различни бактериоцини, в синергична комбинация и кометаболизъм с късоверижни киселини и други нискомолекулни метаболити

Сериозно доказателство, че богатият информационен масив, изнесен в обсъдените дотук три глави на дисертацията, не е самоцелен и изолиран е последната глава 4. Тя е озаглавена "Технологични характеристики и приложимост на млечнокиселите бактерии от различни екологични ниши за разработката на функционални храни и в медицината". По своята съдържателна същност тази глава до голяма степен отразява квинт-есенцията на рецензирания дисертационен труд. Ако в началото ѝ трябваше да има мото, спокойно можеше да се използва известната теза на Луи Пастър, че „ няма фундаментална и приложна наука, а само наука и нейното приложение в практиката“. В тази четвърта глава последователно са обсъдени технологично значимите характеристики на млечнокиселите бактерии, в т.ч. : ацетогенезата при различни условия, преживяемостта при лиофилизация, протеолитичната и амилитичната активности като важен компонент от ензимния профил, коагулиращата способност, използването на олигозахаридни пребиотици като субстрат, влиянието на консерванти, срока на съхранение и пр.

Верижната взаимовръзка: технологичен процес → качество на продукцията → консумация → пазарна реализация е сполучливо илюстрирана чрез методите за сензорен анализ, респ. – чрез визуалната и органолептичната профилограми, представени на фигури 140 и 141. Постигнатите резултати правят възможно един значителен дял от новоохарактеризираните щамове да бъдат номинирани като продуценти на кандидат-пробиотици, подходящи за комбиниране с традиционни стартерни култури. Нещо повече – много от тях са подходящи за ко-ферментация с индустриални закваски, за добавки към нови функционални храни с перспективна пазарна реализация и за съ-участие в т.нар. кооперативен ефект. Всичко това в своята съвкупност е важна и незаобиколима отсечка по пътя между лабораторията, пилотната инсталация, производствения цех и пазара.

3. Анализ и оценка на изводите и приносите

Както номинално е възприето, дисертационният труд завършва с изводи и със справка за приносите. Изводите са 17 на брой. Смесово те са свързани със заключителните дискусии, изложени преди това в края на всяка глава. Кореспондират с изнесените и обсъдени резултати, така че могат да се възприемат като екстракт, селекция и синтез на най-важното от текстовото съдържание.

Поради многопластовата си природа изводите трудно биха станали предмет на друг тип преструктуриране или на обединяване и съкращаване. При стилистичното им оформление успешно са избегнати многословието и двусмислиците, звучат ясно, разбираемо и достатъчно категорично. Повечето от изводите са с констативен характер, но все пак бих маркирал последните три

като имащи технологично и прагматично звучене. Разбира се, не бива да се подминават и изводи №№ 3, 5 и 6, в които определено се реферират пионерни за нашата микробиологична наука постижения.

С основание приносите са разпределени в три групи, съобразно авторската преценка – 5 с оригинален научно-теоретичен характер, 5 – с потвърдителен характер и 7 – с научно-приложна насоченост. Усетена е тънката разлика между „изводи“ и „приноси“ и не се е стигнало до излишна тавтология. Влизайки в класификационната схема на автора, като цяло подкрепям предложената справка. В никакъв случай не бива да се подценява систематизираното в извод № 2 под рубриката „За първи път“. Действително, става дума за оригинални и новаторски изследвания и резултати, за научна информация от иновационен клас.

Признание заслужават и последните три научно-приложни приноси (№№ 5, 6 и 7 от раздел В). Те забележимо повишават относителното тегло на дисертацията, особено от гледна точка на добрата производствена практика. Известна резервираност запазвам само спрямо принос № 3 от раздел А, за който ми се струва, че е с твърде общо звучене. До известна степен това е валидно и за принос № 5 от раздел Б. Не причислявам това мое становище относно двата приноса към раздела „Критични бележки и препоръки“ (вж по-долу), тъй като то ни най-малко не променя отличните ми впечатления от дисертационния труд.

4. Кратък преглед на научните публикации, тематично свързани с дисертацията

Както е видно от приложения накрая списък, касае се за внушителното число от 32 публикации. 4 от тях са глави или обзори от книги, също така – учебници и учебни пособия. Останалите 28 са журнални статии в реферирани периодични издания. Около половината от тях са в реномирани западни списания с висок IF (1,5 – 2,0). Общият IF на публикуваните работи възлиза на малко повече от 30. За отзвук от тези публикации сред научните среди може да се съди по броя на забелязаните цитати – 294. Тези журнални статии със съавтор д-р Св. Данова са излезли от печат в периода 1998 – 2014 г.

Отделно от този набор, с отношение по-скоро към литературния обзор, могат да се посочат още 6 публикации, предимно в българска периодика. Погледнато по-нашироко, извън ограничителните рамки на дисертационния труд, д-р Данова е автор и/или съавтор общо на 84 научни публикации (вкл. и горепосочените). Приблизителният брой на цитиранията е между 385 и 654 (в зависимост от регистриращата система). Тя е и активен участник в наши и международни научни форуми – 55 участия с доклади и постери към януари 2015 г. Участва и в научни проекти и експертизи.

Приведените данни са необходими за съпоставка с критериите за научната степен дбн, според заключителните разпоредби на глава 7 от Правилника на ИМб. Публикациите след защитен докторат следва да са 20, в нашия случай те са 28. Цитиранията и импакт-факторът (общо за научната кариера) се изисква да бъдат респективно 150 и 25. При д-р Данова те са наднормени – съответно 385 и 30,161. Не по-маловажно е обаче, че тези данни имат пряко отношение и към рецензираната дисертация. По същата логика не мога да не прибавя към активите на г-жа Светла Данова и успешно защитените под нейното научно ръководство 4 „малки“ докторски дисертации – в интервала 2007 – 2013 год.

Цялата тази цифрова информация е съотносима – пряко или косвено – към качеството и стойността на защитаваната днес дисертация. Има обаче още една причина, за да поднеса въпросната информация, макар и компресирано и без коментар. Тя е доказателство, че тази обемиста творба (345 стр., компютърен набор, шрифт 12) не се е появила внезапно и изкуствено. Иначе казано, приведените по-горе числа имат отношение не само към качеството, но и към генезиса на рецензирания труд. Фактически погледнато, дисертацията с книжното си тяло в този вид е еманация, материализиран и полиграфски израз на внушително количество изследователски усилия, активно сътрудничество, издателска, педагогическа и организационна работа в продължение на две десетилетия.

5. Критични бележки и препоръки

По време на апробацията през м. януари т.г. бе станало дума за някои пропуски и неточности в проекта. С удовлетворение сега може да се отбележи, че в окончателния вид на дисертацията те са отстранени, направени са и някои вътрешни преобразования в текста. Останали са само няколко незначителни повода за критика. Например, при някои от фигурите има неправомерно смесване в надписите на български и английски. Второ, откриват се частични несъответствия между обявените заглавия в съдържанието отпред (на нулевата страница) и реалните заглавия и подзаглавия в текста. Например, „Заклучителна дискусия и изводи” и „Заклучителна дискусия”; подобни отклонения има още на стр.219, 289 и др. Трето, противно на общоприетата практика списъкът с използваните съкращения е даден не в началото, а накрая, което е по-неудобният вариант.

Колкото до препоръките, мисля, че в дисертацията има още много „неекстрахирано сухо вещество” и тя може да се дисеминира с помощта на поне две или три нови публикации. Отделно от това може да се помисли за оформяне на методическата част и на литературния обзор като отделен свитък или свитъци с образователно предназначение.

6. Кратки биографични данни и лични впечатления за автора

Активната публикационна дейност на Светла Данова, зараждането и изработването на настоящата дисертация не са протичали спонтанно или автоматично. Фактически те са съпътствали постепенното изграждане на доц. Данова (особено – след докторантурата) до признат и ясно разпознаваем специалист в сферата на съвременната микробиология, вкл. и с международен опит. Споделям убеждението, че цялата нейна професионална биография е пример за естествения развой на събитията в контурите на една академична кариера, с неизбежните плюсове и минуси.

Познавам Светла Данова още от студентското ѝ битие, т.е. от 80-те години на миналия век, а сега ѝ предстои да навърши 52 години. Дипломира се в СУ през 1987 г., специалност Молекулярна и функционална биология, специализация Микробиология. Доктор по биология от 1998 г., специализирала е във Франция. Характерни нейни черти са отдаденост на научноизследователската работа, висок професионализъм в областта на микробиологията и развито чувство за отговорност.

7. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В края на изложението си, въз основа на цялостната ми представа за рецензирания труд, ще се опитам да привлека вниманието ви върху три възлови моменти, касаещи конкретния дисертационен труд.

Първо, работата е наситена с много фактология. Това не е някаква неочаквана или пресилена констатация, ако се вземе предвид, че в нея са сумирани и преосмислени усилията, наблюденията и резултатите от 20-годишен труд на доц. Данова и на ръководения от нея работен екип.

Второ, текстът е наситен с изключително богата релевантна и логистична научна информация, подложена при това на целеви анализ, в режим на задочни диалози с множество чуждестранни автори. Както бе посочено по-горе, пикът на реферираната информация е разположен в годините между 2005 и 2013. Това говори за интерес към новостите и за постоянно „сверяване на часовника“ в ареала на изследвания проблем. То вероятно е един от изворите за научната ерудиция на претендента за доктор на науките.

Трето, ако сега за момент се върнем отново към глава 4, веднага се вижда, че в дисертацията успешно е доказана една прагматична, адресирана към социално-икономическата практика ориентация и от това са произтекли реални резултати.

Тези открояващи се черти – фактология, информираност, актуалност, аналитичност и прагматизъм – са задължителни атрибути на всеки сериозен и защитим дисертационен труд. Същевременно, като се позовем на законовите изисквания на духа и буквата на ЗРАС, по-точно – на чл.12 от този закон, респ. – на чл.37 от Правилника, а така също – на чл.2 и глава 4 от Институтския правилник - ясно се вижда, че въпросният труд действително представлява теоретично и научно-приложно обобщение, покриващо определен сегмент от дадена област на науката и на социално-икономическата практика. По форма и по съдържание той е напълно завършен и в трите възможни измерения – като авторски замисъл, като експериментална реализация и като интерпретация.

Следователно, всички приведени аргументи еднозначно формират убеждението ми да препоръчам на уважаемите членове на Научното жури и на Научния съвет на Института по микробиология да гласуват ЗА придобиването от Светла Трифонова Данова на научната степен „Доктор на науките“.

30 март 2015 г.

Рецензент:
/проф. Райчо Димков/