

# РЕЦЕНЗИЯ

от Проф. д-р Стефан Денев, дсн  
Ръководител катедра “Биохимия и Микробиология”  
при Тракийски университет, гр. Ст. Загора  
върху дисертационен труд на тема:  
**“БИОРАЗНООБРАЗИЕ И ПРОБИОТИЧЕН ПОТЕНЦИАЛ НА МЛЕЧНОКИСЕЛИ БАКТЕРИИ  
ОТ РАЗЛИЧНИ ЕКОЛОГИЧНИ НИШИ”**  
представен за получаване на научната степен “Доктор на науките”,  
по Научна специалност “Микробиология”,  
Професионално направление: “Биологични науки”,  
**на Доц. д-р Светла Трифонова Данова,**  
Институт по Микробиология “Акад. Стефан Ангелов” при БАН

## 1. Общо описание на представените материали

Със Заповед № I-24/17.02.2015 г. на Директора на Института по Микробиология “Акад. С. Ангелов” към БАН съм определен за член на научно жури по процедура за защита на дисертационния труд на доц. д-р Светла Трифонова Данова на тема: *“Биоразнообразие и пробиотичен потенциал на млечнокисели бактерии от различни екологични ниши”* за придобиване на научна степен “Доктор на науките” по научна специалност “Микробиология”.

Представеният от кандидата комплект от материали (на хартиен и електронен носител) е в съответствие със Закона на развитие на академичния състав в Република България и Правилника за неговото приложение, и включва следните документи: **1)** Автобиография; **2)** Автореферат; **3)** Дисертационен труд; **4)** Списък и копия на научните публикации, включени в дисертацията; **5)** Списък на цитиранията; **6)** Протокол от разширен съвет, за предварително обсъждане (апробация) на дисертационния труд; **7)** Нотариално заверено копие на Диплома за присъждане на научната степен “Доктор” и др.

Дисертацията е написана на 345 стандартни машинописни страници. Тя е правилно структурирана и е много добре онагледена с 146 фигури и 66 таблици. Библиографията включва общо 789 цитирани литературни източника, от които 767 - на латиница и 22 - на кирилица.

## 2. Актуалност на дисертационната тема

Дисертационният труд е посветен на актуален проблем, свързан с биоразнообразието и пробиотичния потенциал на млечнокиселите бактерии (МКБ), произхождащи от различни екологични ниши в България. Темата е актуална и от научна и от практическа гледна точка. Планираните и проведените научни изследвания са в областта на видовото и вътревидовото разнообразие на МКБ, изолирани от различни местообитания и установяването на тяхната таксономия, пробиотична активност, функционалност, безопасност и технологична приложимост при разработката на нови функционални храни на пробиотична основа с ценни

диетични, профилактични и здравни характеристики. Тези проблеми са едни от приоритетните в съвременната нутритивна микробиология и биотехнология, и в експерименталната медицина.

### **3. Познаване на проблема**

Литературният обзор е с обем 54 стр. Той представлява задълбочен/монографичен анализ на съвременната литература, публикувана през последните 10 г., което показва, че авторът познава актуалността и състоянието на проблема. Написан е компетентно и аналитично, което демонстрира богатата литературна осведоменост на докторантката и е доказателство за дълбоките и познания по разработваните в дисертацията актуални проблеми. Познаването и анализът на цитираните литературни източници дава възможност обосновано да се акцентира върху фенотипните, таксономичните, молекулярно-генетичните, функционалните, пробиотичните и технологичните характеристики на МКБ, произхождащи от различни местообитания. Специално внимание е отделено на съвременните селекционни критерии за оценка на пробиотичната активност и нейните характеристики. Много добро впечатление прави акцентирането върху съвременните подходи при изследване биоразнообразието и пробиотичния потенциал на МКБ, като молекулярно-генетичния подход и свързаните с него PCR методи, метагеномни анализи и др.

Задълбоченият преглед и критичен анализ на литературата е позволил на докторантката да открие своята актуална изследователска ниша и адекватно да формулира целта и задачите на дисертацията, които я характеризират като едно мащабно комплексно изследване с несъмнена научно-теоритична и научно-приложна стойност.

Искам да отбележа също, че на някои места в литературния преглед, цитирането на литературните източници не е унифицирано и стандартизирано, съгласно общоприетите изисквания:

- Вместо фамилното име на авторите и годината на публикуване, както се изисква по принцип, на отделни страници в текста са цитирани едновременно личното и фамилното име на автора/те, в цялостен или в съкратен вид. Например: (Stefan Herbel et al., 2013; Erika A. Pfeiler и Todd R. Klaenhammer, 2008 /стр 13/; Michiel Kleerebezem and Elaine E. Vaughan, 2009 /стр.18/; Yukihiro Miyoshi et al., 2006 /стр.33/; R.W. Hutkins, 2006 /стр. 6/; Makarova K. et. al., 2006 /стр.12/; Hammes W.P., Vogel R.F., 1995 /стр.15/ ) и др.;
- Някои от цитираните в литературния преглед автори липсват в списъка на литературата, като . например: (по A.L. 2004; R.W. Hutkins,2006) /стр. 3/;
- Налице са и някои граматични и технически грешки, които е можело да бъдат избягнати чрез по-прецизно редактиране и коригиране на текста, в който са констатирани;

### **4. Методология на изследването**

Разделът „Материали и Методи“ кореспондира с поставената цел и задачи на дисертационния труд, при реализирането на които са използвани разнообразни материали, между които стандартни/референтни щамове от световно известни микробни колекции; универсални, селективни и специални хранителни среди, съвременни култури клетъчни линии, видово специфични праймери, антибиотици, пребиотици, разтвори, реагенти, багрила и буфери на световно признати фирми-производители;

Използвани са съвременни методични подходи и методи за: 1) Изолиране и първично характеризирание на МКБ от различни източници – млечни продукти, вагинални проби и др.; 2) Фенотипна, молекулярно-генетична и таксономична характеристика на новоизолираните щамове; 3) Биологична активност в т.ч. антибактериална, антигъбна, антивирусна и бактериоциногенна активност; 4) *In vitro* оценка на пробиотичния потенциал, съгласно съвременните селекционни критерии за функционалност, между които: а) устойчивост на ниско рН и жлъчни соли, на стомашен и чревен сок; б) оценка на преживяемостта в различните отдели на гастроинтестиналния тракт (ГИТ); в) адхезивна способност към различни клетъчни линии; г) наличие на повърхностно-разположени белтъци; 5) Автоагрегационна, агрегационна и коагрегационна способност на щамовете; 6) Имуномодулиращ потенциал; 7) Електронно микроскопски анализи, на базата на трансмисионна и сканираща микроскопия и др. Подробно са описани и методите за оценка на пробиотичния потенциал на новоизолираните щамове МКБ, съгласно критерия за безопасност, както и технологичните им характеристики и приложимост при производството на пробиотични продукти и функционални храни. Разработката на дисертацията е базирана на голям брой съвременни методи на изследване, в т.ч.: микробиологични, биохимични, физико-химични, потенциометрични, спектрофотометрични, микроскопски, електронномикроскопски, електрофоретични, газ-хроматографски, реологични, молекулярно-генетични и др. Представени са и статистическите методи за анализ на експерименталните данни. Използваните многобройни методи на изследване и статистически анализ на резултатите са съвременни и адекватни на целта и задачите на дисертационния труд. От една страна, те са добра гаранция за обективността на получените резултати и на направените от тях изводи, а от друга - атестат за високата научно-методична компетентност на дисертантката.

## **5. Резултати и обсъждане**

В този раздел, последователно и систематизирано са представени експерименталните данни на автора от проведените научни изследвания, които са доста мащабни, прецизни и диференцирани. Резултатите от изследванията и техният анализ са представени в един внушителен обем, от около 200 стандартни страници, включващ 146 фигури и 66 таблици. Според мен представянето на резултатите и техният анализ, в т.ч. и статистическият са в

унисон със стандартните изисквания. Целият раздел е написан обективно, компетентно и задълбочено, което говори не само за сериозната подготовка на докторантката, но и за сериозния характер на приносите.

Представени са интересни резултати относно биоразнообразието от МКБ, произхождащи от различни местообитания. Високо дискриминативните молекулярни методи успешно са комбинирани с фенотипните и на базата на комплексен полифазно-таксономичен подход е извършена видовата идентификация на МКБ, принадлежащи към различни филогенетични групи. Успешно са изолирани и са идентифицирани над 200 щамове МКБ. Определено е видовото им разнообразие и доминиране в изследваните екологични ниши, което представлява оригинален принос с важно научно-практическо значение. Оптимизирането на условията и подбора на праймерите, при тези анализи, както и допълнителното характеризирание и генотипизиране на млечнокиселите изолати е несъмнен методичен принос.

Познаването на видовото разнообразие на микрофлората на ферментационните продукти е сред научните проблеми с важно практическо значение. За пръв път в български бели саламурени сирена е изолиран и доказан вида *L. acidipiscis*. Установена е доминиращата позиция и на *L. brevis* в микрофлората на традиционния млечен продукт – катък и български кисели ржени закваски, а заедно с *L. plantarum* - и в късните етапи на зреене на традиционното бяло саламурено сирене.

На основата на полифазно-таксономичния подход за пръв път в България е изследвано видовото разнообразие на МКБ от клинични проби и по-специално вагиналната микробиота при клинически здрави жени в репродуктивна възраст. Доказана е доминиращата позиция на *L. fermentum*, както и на видовете *L. gasseri*, *L. crispatus*, *L. jonsonii*, *L. salivarius*, *L. ramosus*, *L. plantarum*, *L. brevis* и др. в състава и. На базата на сериозни комплексни изследвания са установени бариерните механизми, осигуряващи здравословния хомеостаз на влагалището, които се основават на щамово-специфична комбинация, способна на активно подкисляване на средата, продукция на антимикробни субстанции като водороден перексид и бактериоциногенни вещества в съчетание с адхезивната способност и агрегационните свойства на вагиналните лактобацили.

При висок процент от новоизолираните щамове от различни местообитания е доказана подчертана антибактериална, антигъбна и антивирусна активност, което е несъмнен оригинален принос, защото антимикробната активност е общопризнат критерий при подбора на потенциални пробиотични щамове и е основа за разработването на биопротективни стартерни култури с подчертана бактериоциногенна активност.

Оригинални са и резултатите, относно спектъра и механизмите на антимикробната активност на над 150 новоизолирани щамове МКБ – продукция на млечна киселина, водороден

прекис, бактериоцини и факторите, влияещи върху нея. Направен е и опит за изолиране на бактериоцин-подобни вещества. Характеризиран е спектъра и на антигъбната активност на подобрани лактибацили чрез газовохроматографски анализ за определяне природата на активните метаболити. Несъмнен интерес представляват и резултатите, характеризиращи природата и условията на продукцията на антигъбни метаболити в моделни системи.

Нов аспект в характеризирани на био-протективните и пробиотичните свойства на МКБ от различни местообитания са резултатите от изследването на антивирусната им активност. Те позволяват на автора да установи най-важните антагонистични механизми на действие на МКБ спрямо вирусите (стр. 199), факт, който до момента не е бил предмет на други изследвания у нас независимо от своята актуалност.

Експерименталните данни, свързани с антимицробната активност на новоизолираните МКБ са добра основа за подбора на различни щамове с цел прилагането им като биоконсерванти и пробиотици. Тези резултати са перспективни не само за приложение при производството на функционални храни, но и за целите на профилактиката на различни заболявания.

Важен етап в характеризиранието на МКБ от различни екологични ниши заема оценката на техния пробиотичен потенциал и функционални характеристики (Глава 3, стр. 201). По тази причина, една значителна част от изследванията са посветени на транзитната толерантност и устойчивост на новоизолираните щамове МКБ към факторите на ГИТ (*in vitro*) – растеж и преживяемост при различно рН, стомашни ензими, стомашен и чревен сок, жлъчни соли. Интересни са и резултатите от комплексната оценка на транзитната толерантност на подобрени щамове в динамичен модел на пасаж през ГИТ. Оригинален характер имат и данните от изследванията върху адхезивната способност на лактобацили, изолирани от различни местообитания, молекулната характеристика на адхезивните повърхностни клетъчни компоненти и механизмите на трайно колонизиране. За пръв път у нас се прави характеристика на повърхностните структури и визуализиране на повърхностно разположените белтъци на базата на трансмисионна и сканираща електронна микроскопия. Търсени са генетични детерминанти, отговорни за синтеза на повърхностни структури на базата на молекулярни изследвания с цел по-пълното изясняване адхезионния потенциал на щамовете. В подкрепа на цитираните изследвания са и резултатите относно агрегационния фенотип на лактобацилите от различните местообитания. Подчертан научно-теоритичен и научно-приложен принос имат и експерименталните данни, характеризиращи имуномодулаторната роля на някои млечни лактобацили, която е свързана с техния профилактичен и терапевтичен потенциал.

Резултатите от изследванията върху функционалните характеристики на МКБ, съгласно критериите за безопасност, също са едни от първите по рода си у нас. Определена е

антибиотичната чувствителност на новоизолирани лактобацили спрямо 31 антибиотика, принадлежащи към различни групи. Изследвани са и плазмидните профили на кандидат-пробиотични щамове МКБ, което също оценявам като положително.

Изследванията върху технологичните характеристики и приложимост на МКБ за разработката на функционални храни и в медицината са представени в Глава 4. Те включват голям брой съвременни показатели: киселинообразуване; технологична стабилност и преживяемост; протеолитична, казеинолитична и амилаолитична активност; коагулационна способност; инхибираща и ензимна активност; усвояване на пребиотици от олигозахариден тип; преживяемост в различни млечни продукти; оценка на биопротективните свойства и на приложимостта на подбрани щамове като пробиотични добавки; сенсорен анализ; реологични характеристики и пр.

Всяка глава от раздела „Резултати и обсъждане“ завършва с професионално направена дискусия и с по няколко заключения, произтичащи от професионалния анализ на експерименталните резултати.

## **6. Изводи**

Резултатите от изследванията в дисертационния труд са обобщени в 17 изводи, които са адекватни, произтичат от получените експериментални данни и показват, че поставената цел и задачи на дисертационния труд успешно са реализирани.

## **7. Приноси**

Приемам направените от дисертантката приноси с оригинален научно-теоритичен, научно-приложен и потвърдителен характер, които показват, че дисертационният труд представлява едно съвременно и завършено изследване с важно научно-приложно значение и първо по рода си комплексно проучване на уникалните качества на българските млечно кисели бактерии.

## **8. Публикации и цитирания**

Във връзка с дисертацията са публикувани:

- **28** научни статии, на английски език, в авторитетни реферирани научни списания, **с общ импакт фактор = 30.161**;

- **14** научни статии, от които **(3)** - в чуждестранни и **(11)** – в български списания без импакт фактор;

- **17** научни статии, отпечатани в книги и сборници, от които: **(5)** - в чужбина и **(12)** - в България;

**Публикуването на по-голямата част от резултатите в дисертационния труд, в авторитетни чуждестранни издания, със сравнително висок импакт фактор, само по себе си е доказателство за научната им стойност и оценка за тяхното качество от гледна точка на актуалност, методична издържаност и оригиналност.**

Доказателство, че дисертационният труд е лично дело на дисертанта е обстоятелството, че в 11 от представените научните статии тя е първи – водещ автор; в 11 - е на второ място; в 9 - на трето място, като в 22 е кореспондиращ автор. Считам, че водещото участие на автора в изследователския процес, свързан с дисертационния труд, е сравнително добре представено.

Голяма част от експерименталните данни в дисертацията, допълнително са представени в 7 доклада и в 51 постера от участия в авторитетни научни форуми, свързани с тематиката на дисертационния труд, които са докладвани лично от докторанта;

Цитирането на публикуваните във връзка с дисертацията научни трудове в съвременната литература е друг обективен критерий за значимостта на проведените научни изследвания, както и на резултатите и приносите в тях. В тази връзка следва да отбележа впечатляващия брой на установените и представените до момента цитати на публикуваните научни трудове – общо 294, голяма част от които са в издания с висок импакт фактор, в чуждестранни монографии и дисертации. Значителна част от тях са регистрирани в международната научно-информационна система SCOPUS, където авторът на дисертацията е с h-index = 11, което е един от обективните наукометрични критерий за международното му признание като учен.

**През периода на разработката на дисертационния труд, под вещото ръководство на дисертанта, успешно са защитени 4 дисертации за присъждането на ОНС „Доктор“, което също заслужава висока оценка.**

Авторефератът е с обем 95 стр. Той отразява точно съдържанието на дисертационния труд, основните изводи, приносите и публикациите, свързани с него.

**Заключение:** Представеният ми за рецензиране дисертационен труд за присъждането на научната степен „Доктор на биологичните науки“ на тема: **“БИОРАЗНООБРАЗИЕ И ПРОБИОТИЧЕН ПОТЕНЦИАЛ НА МЛЕЧНОКИСЕЛИ БАКТЕРИИ ОТ РАЗЛИЧНИ ЕКОЛОГИЧНИ НИШИ”** с автор Доц. д-р Светла Трифонова Данова от Института по Микробиология на БАН е напълно завършен научноизследователски труд. Той съдържа редица оригинални научно-теоритични, научно-приложни и потвърдителни приноси, които са получили национално и международно признание, посредством публикуването им в авторитетни научни списания с импакт фактор и в други научни издания. С това, дисертационният труд напълно отговоря на ЗРАСРБ, поради което препоръчвам на уважаемите членове на Научното жури да гласуват единодушно с положителен вот за присъждането на научната степен "Доктор на биологичните науки" на Доц. д-р Светла Трифонова Данова.

Дата: 20.03.2015 г.

РЕЦЕНЗЕНТ:.....

Проф. д-р. Стефан Денев