

РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационен труд, представен пред научно жури, сформирано със заповед № I-24/17.02.2015 на директора на Институт по микробиология “Стефан Ангелов”, БАН за получаване на научна степен “доктор на биологическите науки”, научна област 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3. Биологически науки

Автор на дисертационния труд: Доц. д-р Светла Трифонова Данова

Тема на дисертационния труд: “БИОРАЗНООБРАЗИЕ И ПРОБИОТИЧЕН ПОТЕНЦИАЛ НА МЛЕЧНО КИСЕЛИ БАКТЕРИИ ОТ РАЗЛИЧНИ ЕКОЛОГИЧНИ НИШИ”

Рецензент: проф. д-р Вяра Николаева Иванова

1. Данни за дисертанта

Доц. д-р Светла Трифонова Данова е завършила висшето си образование (специалност Молекулярна и функционална биология) в Биологическия факултет на СУ „Св. Кл. Охридски” през 1987 година. Работила е като специалист-микробиолог, а от 1989 г. е била редовен докторант в катедра Обща и промишлена микробиология на СУ, където през 1994 г. получава научната степен „кандидат на биологическите науки”. От следващата година тя е последователно специалист-микробиолог и асистент в катедра Обща и промишлена микробиология на СУ, а от 2000 г. до настоящия момент е най-напред н.с. I ст., а от 2005 г. – ст.н.с. II ст. и доцент в Института по микробиология на БАН, в секция Микробна генетика. Специализирала е общо около 2 години във Франция и Южна Африка.

2. Актуалност на дисертационната тема

Известно е значението и ползата от млечно киселите бактерии и тяхното прилагане за получаване на традиционни млечнокисели и нетрадиционни ферментирани млечни продукти. МКБ са природен фактор за поддържане и подобряване на човешкото здраве. От друга страна способността на различни МКБ да колонизират мукозните повърхности, превръщайки се в част от протективната микрофлора с полезни биологични свойства, ги прави изключително важни за възстановяване на гастроинтестиналния и урогениталния тракт. Еко-климатичните условия в дадени географски райони съдействат за формиране на определени типове популации от МКБ, което води до създаването на множество регионални продукти, част от които са слабо проучени или непроучени до момента. Такива са катъкът, бялото саламурено сирене, ръжените кисели теста, домашните сурово-сушени луканки, кумисът. Комплексните изследвания на млечнокиселата микрофлора на българските традиционни продукти е начин да се опознае видовото разнообразие, взаимодействието и стабилните микробни популации, отговорни за процесите на получаване и/или

съхранение на продуктите и богатството на органолептични характеристики. Научните данни за биоразнообразието на МКБ от различни местообитания, за техния пробиотичен потенциал и технологичнозначимите им свойства, които са обект на изследване в дисертационния труд, са от особено важно значение за бъдещите производства на функционални храни, пробиотици и за медицинската практика.

3. Общо представяне на дисертацията и оценка на нейната структура

Дисертационният труд е конструиран изцяло според изискванията за трудове от подобен характер и съдържа 9 раздела и 4 подраздела в оптимално съотношение на техния обем, изводи и справка за приносите, списък на публикациите по дисертацията, резюме, използвани съкращения. Допълнително към документите е приложен списък на намерените цитати. Общият обем на дисертацията е 345 стр, резултатите са подкрепени от 143 фигури и 66 таблици. Библиографската справка включва 790 заглавия, от които 22 на кирилица, 3 интернет сайта и останалите на латиница.

В литературния обзор с обем 54 стр., подкрепен с 11 таблици и 12 фигури, доц. д-р Данова прави обща характеристика на хомо- и хетероферментативните мезофилни и термофилни млечнокисели бактерии, спира се на основната таксономична характеристика на МКБ от род *Lactobacillus*, на съвременните подходи за изследване биоразнообразието им - класически фенотипни методи за идентификация, сравняване на биохимичните профили, съвременни молекулярно-генетични методи, базиращи се на анализ на тоталния геном или на части от него. Разгледана е необходимостта от прилагане на полифазно-таксономична характеристика на род *Lactobacillus* като съвременен комплексен подход за идентификация, който се основава на данните от класически, хемотаксономични и молекулярно-генетични критерии. Подробно са обсъдени предимствата на PCR базираните методи като мултиплекс PCR, PCR-дактилоскопия и нейни варианти, на секвенционния анализ на вариабилните региони от гените за 16S рибозомалната ДНК, на метагеномните анализи и други методи. Проследени са разпространението на МКБ в различни млечни и немлечни ферментационни продукти и храни, като част от микрофлората на хора и животни, характеристиката на млечнокиселите бактерии като пробиотици, различните подходи при характеризиране на пробиотичния потенциал и при подбора на пробиотици сред МКБ, например устойчивост към стомашен сок, към условията в дуоденума, при преминаване през червата, адхезията на млечнокисели бактерии и адхезионните фактори, повърхностните белтъци при млечнокиселите бактерии, имуномодулиращата способност и здравословните ефекти на пробиотични лактобацили, способността им за усвояване на пребиотици, антимикробната активност на МКБ. Направен е преглед на технологичните характеристики и подбора на МКБ за целите на пазара на функционални храни, ролята на млечнокиселите бактерии при получаването на ферментационни продукти, микрофлората на стартерни и не-стартерни култури, приложението и значението на МКБ за пазара на функционални храни и пробиотични продукти.

На база на подробната обзорна част е формулирана целта на дисертационния труд – Проучване на видовото и вътревидово разнообразие на новоизолирани щамове

МКБ от различни екологични ниши, охарактеризиране на биологичната им активност, пробиотичен потенциал и технологична приложимост. Формулирани са и пет основни задачи с по няколко подзадачи: - Разработване и приложение на комбиниран полифазно-таксономичен подход за видова идентификация и мониторинг на МКБ в различни местообитания; - Полифазно-таксономична характеристика на млечнокисели бактерии от традиционни млечни и немлечни ферментационни продукти и вагинална микробиота и създаване на лабораторна колекция; - Характеризиране *in vitro* и *in situ* на антимикробната (антибактериална, антигъбична и антивирусна) активност на млечнокисели бактерии, изолирани от различни местообитания; - Определяне на пробиотичния потенциал на подобрени МКБ съгласно *in vitro* критериите за функционалност и безопасност, приети при подбор на пробиотици; - Изследване на технологично-значими свойства на МКБ с цел да се подберат пробиотични щамове с потенциал за разработване на функционални храни и пробиотични продукти с полезни за здравето ефекти.

Следващият раздел на дисертацията представлява подробно описание на всички използвани материали и методи. На 28 стр., 3 фигури и 9 таблици доц. д-р Данова е написала практически ръководство по класически микробиологични и молекулярно-генетични методи - събиране на проби от домашни млечни продукти, комерсиални сирена, изолиране от млечните продукти и от вагинални проби и от кисели закваски, фенотипна характеристика, физиолого-биохимична, ферментационен профил на изолатите, изолиране на хромозомна, тотална и плазмидна ДНК, PCR анализи, ARDRA анализи, PCR амплификация с видово-специфични праймери, 16S рДНК амплификация и секвенционен анализ, Dot-блот хибридизационен анализ и други генетични техники. Подробно са описани и методите за оценка на пробиотичния потенциал, идентифициране на гените, кодиращи продукцията на бактериоцин-подобна субстанция, анти-вирусно действие на вагинални МКБ, *in vitro* оценка на пробиотичния потенциал, съгласно критериите за функционалност, определяне адхезионната способност на МКБ и механизмите за трайна колонизация, определяне способността за образуване на биофилм от вагинални и бактериоциногенни лактобацили, технологични характеристики и приложимост на подобрени щамове МКБ, преживяемост на щам *L. plantarum* в търговска форма на пастетно сирене за срока на годност, с и без консервант, оценка за приложимостта на подобрени лактобацили като пробиотична добавка при производството на кисело мляко в комбинация с индустриална закваска. Цялата методология е не само описана подробно, но също обсъдена критично и съпоставена.

Разделът „Резултати и обсъждане“ е представен удачно в няколко (4) подраздела (глави) съобразно поставените задачи. Всеки подраздел е придружен от съдържание на проведените изследвания и списък на публикациите, отнасящи се до него. Намирам този подход за много удачен, защото помага за по-лесното ориентиране в богатия доказателствен материал, съпътстващ изказаните от доц. д-р Данова тези. Всеки раздел е придружен и от заключение, обобщаващо в по-лесна за осмисляне форма най-важните резултати от проведените изследвания. Общо в този раздел резултатите са подкрепени от 128 фигури и 46 таблици.

С помощта на комбиниран микробиологичен подход и използването на различни селективни условия и хранителни среди са изолирани над 300 оригинални щама. Те са в основата на създадена колекция от 151 щама изолати от млечни храни, отнесени към род *Lactobacillus* по морфологични характеристики и чрез класически фенотипни методи; изолирани са също 86 чисти култури от млечнокисели бактерии от други ферментационни продукти, с различна морфология на клетките (коки и пръчици) и на колонииите, и 50 вагинални изолата от български жени в репродуктивна възраст.

Показано е, че най-голямо морфологично разнообразие (като тип на колонииите) и морфология на клетките се среща сред изолатите от кисели ръжени закваски, следвани от тези от катък. Определено е, че пръчковидните форми са доминиращи в почти всички проби от домашно саламурено сирене в късните етапи на зреене, а най-много МКБ с коковидни форми на клетките са открити в пробите от ръжени закваски. На база на използваните биохимични тестове, допълващи морфо-физиологичната характеристика, е направено заключението, че първичното отнасяне, базирано на биохимични резултати, може да бъде разглеждано само като предварителна форма на характеристика на изолатите и има за цел да подпомага избора на подходящи молекулярни методи за следваща видова идентификация.

Полимеразно-верижната реакция с видово-специфични праймери за видовете, към които се отнасят изолатите според резултата от API тестовете, е използвана като основен подход за молекулярната идентификация на изолатите от различни екологични ниши. Приложен е мултиплекс PCR, който дава възможност за разграничаване на три близкородствени вида, генерирайки амплификационни продукти с различна големина за *L. plantarum*, *L. pentosus* и *L. paraplantarum*. Чрез този метод е определено точното отнасяне на 22 щама от сирене, 23 щама от кисели ръжени закваски и 3 от кисело мляко към вида *L. plantarum*, чието стабилно присъствие в домашно приготвени и други ферментационно получени млечни продукти е в подкрепа на хипотезата за широкото разпространение на вида *L. plantarum* сред храни от растителен и животински произход. Идентифицирани са видовете *L. brevis* сред изолатите от проби домашно приготвени ферментационни продукти и *L. fermentum* в кисели ръжени закваски и сирена.

Чрез полифазно-таксономичен подход са идентифицирани до вид 67 млечнокисели изолата от български ръжени закваски, 4 от катък и 18 от бяло саламурено сирене. Така е поставено едно добро начало в характеризирането на биоразнообразието на млечнокиселата микрофлора на български сирена, ръжени кисели закваски и катък, като за последните 2 продукта това са първите публикувани данни, основаващи се на комплексно таксономично проучване. Благодарение на комбинирането между фенотипни и молекулярно – генетични методи е открито неподозирано разнообразие от видове в традиционните саламурени сирена. Доказано е стабилното присъствие в домашно приготвени и други ферментационно-получени млечни продукти на различни видове хомо- и хетероферментативни МКБ.

Извършени са ARDRA анализи на вагинални лактобацили и допълнително характеризиране и генотипиране на вагинални изолати с RAPD-PCR анализ. Наблюдавана е много добра диференциация на щамово и подвидово ниво за изследваните вагинални изолати. Доказано е, че чрез PCR дактилоскопия с BOX, ERIC

и REP-праймери се получават много добри полиморфни профили, позволяващи отлично разграничаване на отделните референтни лактобацили от видове, докладвани за вагината, и щамово-специфични за част от вагиналните изолати. Освен това е извършен 16S рДНК секвенционен анализ след фенотипно характеризиране на 42 вагинални щамове, чрез което е направена тяхната видова идентификация. В комбинация с молекулярно-генетични методи е потвърдено отнасянето до вид на редица лактобацили от създадената колекция.

Приложеният секвенционен анализ доказва наличието на разлики между резултатите за биохимичен профил/фенотип и молекулярната идентификация, което подчертава необходимостта от прилагане на комбиниран полифазно-таксономичен подход за характеризиране на видовото разнообразие в тази специфична екологична ниша. Полифазно-таксономичният подход е допълнен с различни генотипиращи методи като – RAPD, rep-PCR, ARDRA и риботипиране. Най-широко е използван RAPD анализът с цел генерирането на специфични ДНК профили. Проведените изследвания категорично доказват, че паралелното приложение на различни методи дава много по-висока надеждност в таксономичния анализ. Така например са идентифицирани щамове, принадлежащи на различни видове: *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus fermentum* и *Lactobacillus brevis*-подобни. Чрез новосъздадени нерадиоактивно-белязани ДНК сонди за 5 от изпитваните щамове е доказано, че принадлежат към видовете *L. reuteri*, *L. crispatus* и *L. helveticus*.

С помощта на високо дискриминативния Rep-PCR анализ успешно са разграничени трите филогенетично близкородствени вида *L. plantarum*, *L. pentosus* и *L. paraplantarum* и в комбинация с високодискриминативния RAPD, е доказана вътревидова хетерогенност на изолатите от *L. plantarum* от български сирена и кисели ръжени закваски.

В резултат на изследването са идентифицирани и генотипирани над 150 оригинални щамове с хранителен произход, които могат да бъдат охарактеризирани и приложени в производството на полезни за здравето храни.

Следващата глава от резултатите е посветена на изучаване на антимикробната активност на перспективните изолати и определяне природата на продуцираните антимикробни вещества. Доказано е, че лактобацили както с човешки, така и с хранителен произход проявяват щамово-специфичен спектър на активност срещу Грам (+) и Грам (-) бактерии и клинични тест-култури, вкл. проблемни мултирезистентни щамове. Щамове *L. plantarum* и *L. brevis* синтезират активен пептид(и)/белтък с широк спектър на антибактериална и антигъбна активност. За част от подбраните бактериоциногенни култури е доказана анти-гъбична и анти-вирусна активност. Определено е, че щамовете от видовете *L. bulgaricus*, *L. plantarum* и *L. brevis*, при съвместно култивиране, продуцират активни метаболити срещу близкородствени видове. Щамове *L. plantarum* са естествени антагонисти на развалящи храните микроорганизми и различни патогени, вкл. *Staph. aureus* MRSA, природно-резистентните *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa*. Показано е, че бактериоциногенни вагинални щамове *L. salivarius* AG1 и *L. fermentum* 303 притежават полезни биологични свойства и могат да бъдат използвани за разработване на препарати за реколонизация и терапия.

В третата глава са охарактеризирани активни кандидат-пробиотици, притежаващи свойства, които ги определят като обещаващи агенти в разработката на нови функционални храни и в терапевтични подходи за нуждите на профилактиката и терапията на проблемите в храносмилателния и в уровагиналният тракт. Проведени са комплексни изследвания с над 200 български щама, чрез които е доказано, че щамовете, изолирани от различни местообитания съчетават по уникален начин разнообразна по своя характер транзитна устойчивост към неблагоприятните условия на ГИТ и способност да колонизират мукозните повърхности в УГТ/ГИТ, активно противодействайки на патогените/нежеланата микрофлора. Определено е, че хранителните изолати от видовете *L. plantarum* и *L. brevis* показват добра транзитна толерантност в условия симулиращи ГИТ, с по-висока устойчивост към жлъчни соли и панкреатин и по-ниска преживяемост при кисело рН и пепсин. Чрез *in vitro* тестове по характеризиране на МКБ от различни местообитания е доказано, че полезните свойства, свързани с критериите за функционалност и безопасност, са щамово и порядко видово-зависими и не се определят от екологичната ниша, от която са изолатите. Определено е, че изолатите от видовете *L. plantarum* и *L. brevis* са развили агрегационен фенотип и повърхностни структури, подобни на SLP и др. белтъци, опосредстващи адхезията към епитела, и имат по-добра устойчивост към въздействия на антибиотици, на факторите в ГИТ и др. неблагоприятни фактори.

Четвъртата глава, отнасяща се до технологичната характеристика на избрани изолати, съвсем естествено завършва този комплексен научен труд. Представени са лабораторни *in vitro* и *in situ* тестове основно за две добре приети на пазара форми-пастетно сирене и кисело мляко. Доказано е, че *L. plantarum* RL34, *L. brevis*, *L. salivarius* и други от изпитваните щамове се явяват перспективни пробиотични щамове с реални възможности за практическо приложение на пазара на функционални млечни храни. Определено е, че някои от изследваните щамове лактобацили усвояват пребиотици под формата на олигозахариди и тази способност е видово/щамово специфична и не зависи от произхода им. Установено е, че лактобацилите от катък, бяло сирене и кисело мляко се характеризират с щамово-специфични вариации в казеинолитичната активност и способността им да коагулират обезмаслено мляко. Освен това комбинират умерено киселинообразуване, ниска казеинолитична активност и технологично добър ефект върху коагулацията на мляко. Щамовете *L. plantarum* от сирена са характеризирани като притежаващи слаби протеолитични и липолитични свойства, но притежаващи висока β -галактозидазна, α - и β -глюкозидазна, фосфатазна и пептидазна активност, което ги прави подходящи пробиотични добавки към стартерни култури с положително въздействие в етапа на зреене на този и други млечни продукти, а освен това са с висока устойчивост към основните консерванти, прилагани в сиренарското производство.

4. Оценка на приносите

Формулирани са 17 извода, които приемам с незначителни забележки като отразяващи получените резултати в дисертационния труд. Приносите на дисертационния труд са очевидни и имат фундаментален и приложен характер. Доц. Светла Данова е дефинирала пет приноса с оригинален научно-теоретичен характер,

пет приноса с потвърдителен характер и седем научно-приложни приноса. Поради ограничения обем на рецензията си позволявам да отбележа само някои от тях в обобщен вид: 1/Разработен е оригинален комплексен подход за таксономично характеризирани на живата млечнокисела микробиота в различни хабитати. 2/Приложен е директен метагеномен анализ при характеризирани на микробно разнообразие в слабо проучените домашни млечни продукти и е доказано наличието на родове с пробиотичен потенциал; 3/Идентифициран е вида *L. acidipiscicus* в състава на саламурено сирене. 4/Направена е комплексна оценка на биоразнообразието на вагинални лактобацили при здрави български жени. 5/Доказан и успешно приложен е нов подход за разграничаване на близкородствените видове от групата на *L. plantarum* (*L. plantarum*, *L. paraplantarum* и *L. pentosus*). 6/Разработени са нови нерадиоактивно белязани ДНК сонди и е разработен алгоритъм за прилагането им при охарактеризиране биоразнообразието сред лактобацили. 7/Охарактеризирани са 6 бактериоциногенни български щама, с възможности за приложение като биоконсерванти. 8/Получени са за първи път данни за доминиращите видове млечнокисели бактерии в български ръжени закваски, тяхната киселинообразуваща способност и антагонистично действие срещу микроорганизми, причиняващи развала на храни. 9/Създадени са прототипи на пробиотични/биопротективни добавки към стартерни култури с подходящи технологични показатели за производство на кисело мляко и пастетно сирене.

5. Публикации, свързани с дисертацията

Авторът е представил в дисертацията списък, съдържащ 32 научни труда, свързани с дисертацията. 4 представляват глави от книги, учебник и становище. Всички останали 28 са публикувани в списания с импакт фактор (общ импакт фактор 30,161). Повечето от трудовете са публикувани в престижни научни списания като *Journal of Applied Bacteriology*, *International Journal of Food Microbiology*, *Antonie van Leeuwenhoek*, *Journal of Basic Microbiology*, *Journal of Applied Microbiology*, *International Dairy Journal*, *Anaerobe* и др. В една от публикациите дисертантката е единствен автор, в четири е първи автор, в други 5 е втори автор, а в 4 - трети. В част от другите публикации доц. Данова е посочена като автор за кореспонденция. Посочени са 60 участия със съобщения и доклади в научни форуми в чужбина и в България, от които 8 доклада. В допълнителен списък към документите и в автореферата доц. Данова е представила и списък на публикации в списания без ИФ, в български списания без ИФ, книги и сборници от конгреси и конференции – общо 23 броя. Така общо доц. Данова е първи автор в 9 публикации, втори в 10 и трети – в девет. Седемнадесет от статиите са цитирани общо 294 пъти, основно от чужди автори в публикации, публикувани в авторитетни научни журналы, което показва значимостта на научните разработки на дисертантката и колективите, с които тя е работила.

6. Оценка на автореферата

В автореферата са отразени основните резултати на дисертационната работа - резултатите от таксономичния анализ на изолираните щамове МКБ, тяхната характеристика, продуцираните бактериоцини, антимикробната им активност,

възможните приложения на част от изолираните щамове МКБ. Дадени са направените изводи и заключения, приноси, списък с научните публикации и цитати, и като обем отговаря на изискванията.

7. Заключение

Направеният разбор ми дава основание да считам, че приносят на доц. д-р Данова е решаващ за разработването на представената дисертация. Искам да добавя, че доц. Данова е търсен специалист, известен авторитет в микробиологичните среди, ръководител на четирима докторанти. Задълбоченото познаване на материята ѝ е позволило да избере много интересна и актуална тема, да докаже поставената цел, да получи резултати, да оформи оригинални и потвърдителни приноси.

Дисертационният труд отговаря по обем и качество на изискванията за дисертации за придобиване на научната степен “доктор на науките”. Работата представлява завършена и прецизно изпълнена разработка с убедителен научен и научно-приложен характер в областта на таксономията, характеристиките, пробиотичните свойства и приложението на МКБ. Оценявайки дисертационния труд в неговата цялостност – идея, цел, задачи, теоретична и методична обезпеченост на изследването, завършеност, оформяне и представяне, бих могла убедено да кажа, че той има голяма научна, а също и приложна стойност. Дисертационният труд показва, че доц. Светла Данова притежава задълбочени теоретични знания и професионални умения. Основните приноси на дисертационния труд са публикувани в чуждестранни и български списания, докладвани са на научни форуми у нас и в чужбина.

Дисертационният труд на тема: **“БИОРАЗНООБРАЗИЕ И ПРОБИОТИЧЕН ПОТЕНЦИАЛ НА МЛЕЧНО КИСЕЛИ БАКТЕРИИ ОТ РАЗЛИЧНИ ЕКОЛОГИЧНИ НИШИ”** с автор доц. д-р СВЕТЛА ТРИФОНОВА ДАНОВА *съдържа научни и научно-приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката и отговарят на всички изисквания* на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ) и Правилника за прилагане на ЗРАСРБ. Представените материали и дисертационни резултати **напълно съответстват** на специфичните изисквания на Института по микробиология на БАН, приети във връзка с Правилника за приложение на ЗРАСРБ. Считам, че представените резултати са сериозен принос към изучаването на млечнокиселите бактерии въобще.

Поради гореизложеното, убедено давам своята **положителна оценка** за проведеното изследване, представено от рецензираните по-горе дисертационен труд, автореферат, постигнати резултати и приноси, и **предлагам на почитаемото научно жури да гласува положително** за присъждане на доц. д-р СВЕТЛА ТРИФОНОВА ДАНОВА научната степен "доктор на биологическите науки" в научна област 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3. Биологически науки.

09.04.2015 г.

Изготвил рецензията:

проф. д-р Вяра Николаева Иванова