

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. дсн Невена Стоянова Богацевска Селскостопанска академия, Институт по почвознание, агротехнологии и защита на растенията „Н. Пушкиров”, София

на дисертационен труд, представен за защита за получаване на образователната и научна степен „доктор” по Професионално направление 4.3 Биологични науки, (Микробиология)

Автор на дисертационния труд: Явор Костадинов Рабаджиев

Тема на дисертационния труд: „Изучаване на род *Lactobacillus* и род *Fructobacillus* в микробиотата на медоносни пчели“

1. Актуалност и значимост на дисертационната тема

Млечнокиселите бактерии са филогенетично разнородна група широко разпространени в природата. Характеризират се с уникални метаболитни активности, които се използват от векове за получаване на разнообразни ферментационни продукти. Млечнокиселите бактерии обитават многообразни екологични ниши, влизат в състава на микрофлората на растенията (цветове, плодове), живеят в съжителство с човек, животни, мекотели (градински охлюв), насекоми, в продукти произведени от дейността на човек (консервирани храни, млечни продукти, месо и месни храни, силажи). Нов потенциален източник на млечнокисели бактерии са богатите на фруктоза цветове на изключително разнообразния растителен мир, които естествено се опрашват 80% от пчели.

Медоносната пчела е едно от най - важните и полезни насекоми за човека на планета Земя от появата и преди 80 милиона години до наши дни. Играе огромна роля в еволюцията на различните растителни видове с пренасянето на прашец от едно на друго растение. Медоносната пчела е удивително съвършенство на природата. Според **Алберт Айнщайн** *“Ако пчелата изчезне от лицето на Земята, човекът ще я последва четири години по-късно”*.

Медът е ферментиран хранителен продукт от млечнокисели бактерии произвеждан от медоносните пчели от нектара на цветовете. Пчелите събират, трансформират, комбинират с конкретни вещества, които те отделят, складират и оставят да узреят във восъчни пити. От познатите 20 000 вида пчели по света едва 11 вида събират и съхраняват мед. От тях 4 вида се използват интензивно от човек

Изучаването на млечнокиселите бактерии в микробиотата на медоносните пчели е модерно направление в микробиологичната наука и определя правилния избор на темата, нейната актуалност и практическа значимост.

2. Оценка на структурата на дисертационния труд

Дисертационният труд е написан на 118 стандартни страници – формат А4, резултатите са обобщени и представени в 21 таблици и 36 фигури. Структуриран е по класическата схема и е балансиран по отношение на обема на всеки раздел.

2.1. Литературен обзор

При избора на темата, формиране на целите и задачите Рабаджиев е подпомогнат от много добрата си литературна осведоменост. Цитирани са 121 автори на латиница. Подробното изучаване на научните достижения през последното десетилетие, отразени в специализираните научни публикации, позволяват на докторанта да постави началото на нови за страната изследвания върху видовото разнообразие на фруктофилните млечнокисели бактерии в чревния тракт на медоносната пчела (*Apis mellifera*), както и да обсъди и приложи полифазния подход за диференцирането на изолираните бактерии на базата на разработените разнообразни фенотипни и молекулярни методи и практики. Представена и е обсъдена актуалната научна информация за ролята на микрофлората в здравословния статус на пчелите, значението на отделните видове млечнокисели бактерии като пробиотици, генетичните им особености, техниките за генетичен анализ, системите за генна експресия, механизмите на транспорт при усвояването на захари, ензимен синтез и анализ на екзополизахариди (екстрацелуларни ензими, имащи отношение към синтезата на хомополизахариди, каквито са гликозилтрансферазите - фруктозилтрансферази и глюकोзилтрансферази).

Докторантът е запознат с основните литературните източници, определящи ролята и значението на фруктофилните млечнокиселите бактерии, естествените им местообитания - цветовете и плодове на растенията, които се посещават и опрашват от медоносната пчела, която ги преработва в уникални природни продукти (пчелен прашец, млечице, мед). *Apis mellifera* е единственото насекомо в света, което произвежда здравословна храна, която се консумира от човека.

Рабаджиев познава задълбочено научните публикации по проблема, правилно ги анализира, разисква и прилага, за да защити своите виждания и научни дирения, както и да интерпретира получените резултати.

2.2. Цел и задачи

Целта на дисертацията и поставените конкретни задачи са формулирани ясно и точно: проучване видовото разнообразие на фруктофилните млечнокисели бактерии изолирани от чревния тракт на медоносната пчела и установяване спецификата на метаболизма им.

2.3. Материали и методи

Разделът “Материали и методи” е представен систематизирано, точно е детерминирана целта на извежданите експерименти. Използван е богат набор от методи за характеризирание на изолираните млечнокисели бактерии: класически, микробиологични (API 50CHL, API ZYM, антимикуробна активност), съвременни аналитични методи (определяне на количество на D глюкоза, D фруктоза, D/L-млечна киселина, оцетна киселина, етанол, белтък; фракциониране и концентриране на екстрацелуларни гликозилтрансферазни ензими; ензимни активности; SDS-полиакриламидна гел електрофореза; ензимен синтез и анализ на екзополизахариди); молекулярни методи (PCR амплификация с родово специфични праймери; видово определяне чрез секвениране на гена за 16S рРНК ; анализ на генната експресия на ензими чрез специфични праймери).

Задълбоченото изучаване на специализираната литература и прецизното изпълнение на методичния план гарантират на докторанта получаването на правдиви резултати.

2.4. Резултати и обсъждане

Данните са правилно обработени, систематизирани и обосновани в изводи и научни приноси, лично дело на докторанта.

За първи път в България са изолирани, идентифицирани и характеризирани млечнокисели бактерии от храносмилателния тракт на медоносната пчела *Apis mellifera* от района на Ботевград, Гоце Делчев и Пловдив.

Разработена е специфична схема за изолиране на фруктофилните микроорганизми от гастроинтестиналния тракт на пчелите, която дава възможност за точно им разграничаване от обичайната микрофлора.

Установено е, че изолатите са фруктофилни млечнокисели бактерии, с доказана осмоотолерантност в среда с 30% фруктоза, което определя щамовата им специфичност.

Изследваните щамове не могат точно да се идентифицират с API50 CHL, докато при анализа с API-ZYM се регистрира специфика в активността на ензимите от въглехидратния метаболизъм.

Докторантът доказва, че изолираните от *Apis mellifera* фруктофилни щамове нямат антибактериална активност.

Установен е ферментационният и ензимен профил на изследваните фруктофилни млечнокисели бактерии. Съставът на крайните апродукти потвърждава факта, че са хетероферментативни.

Доказана е принадлежността на осем фруктофилни щама към род *Lactobacillus* чрез: PCR-амплификация със специфични праймери; PCR-амплификация на 16S-23S ITS на рДНК; чрез секвениране на гена за 16S рРНК четири изолата са идентифицирани като *Lactobacillus kunkeei*.

Идентифицираните щамове на *Lactobacillus kunkeei* са хетерогенни по метаболитен профил.

Потвърдено е, че при щамове на *Lactobacillus kunkeei* се детектира активност на някои ензими от азотния метаболизъм.

Докторантът установява, че изолираните млечнокисели бактерии не синтезират инхибиращи вещества, освен млечна киселина и водороден прекис.

Щамове AG8 и AG9 на *Lactobacillus kunkeei* се различават по нивата на генна експресия на ензимите, които участват в усвояването и транспорта на фруктоза. Експресията е в зависимост от концентрацията на фруктоза и глюкоза. При тези щамове липсва експресия на гена за бактериоцин ABC транспортера.

Идентифицираните щамове H3, H25 на *Lactobacillus kunkeei* притежават глюканзахарзни ензими и разклоняващ ензим с Mт300 kDa, които трансформират захарозата и фруктозата в нектара на растенията и пчелния мед в олигозахариди с пребиотичен потенциал.

Получените данни за нови разклонени захариди при щамове H3 и H25 на *Lactobacillus kunkeei* от докторанта са предпоставка за бъдещи изследвания чрез мутационни и структурни проучвания за изясняване характера на полизахарида и механизма на полимерите, които могат да се използват за синтезиране на полизахариди и олигозахариди с нови свойства за биотехнологията.

Създадена е колекция от фруктофилни лактобацили изолирани от българската медоносна пчела.

Анализът на получените от докторанта резултати отговорят на поставената цел и задачи.

2.5. Изводи и приноси

Приемам направените изводи и приноси, които логично произтичат от получените резултати.

3. Участие на докторанта в изработването на дисертацията

Не познавам докторанта Я. Рабаджиев, но считам, че дисертационният труд е негово лично дело, направляван компетентно от научните му ръководители проф. дбн И. Иванова и проф. д-р И. Илиев.

4. Препоръки, забележки и въпроси

Позволявам си да препоръчам на Явор Рабаджиев правилно да използва научна терминология, да не внася елементи на методика при отразяване на резултатите, да излага мислите си на правилен български език, без повторения и неясни изречения, както и акуратно да откроява собствените си изследвания, заключения и приноси на фона на богатата палитра от научни достижения за изясняване механизма на действие и значение на фруктофилните млечнокисели бактерии при произвеждането на мед от медоносните пчели.

Имам следните въпроси към докторанта:

1. Идентифицираните и характеризирани фруктофилни млечнокисели бактерии от чревния тракт на *Apis mellifera* от кои региони са изолирани? Може ли да се направи изводът, че българската медоносна пчела е носител на ценните фруктофилни млечнокисели бактерии?

2. Извесни ли са други източници на фруктофилни лактобацили в природата?

2. Как е направен подборът на щамовете при провеждане на различните анализи?

3. Каква е ролята на фруктофилните бактерии и по специално на вида *Lactobacillus kunkeei* при производството на мед от медоносните пчели ? Защо се счита, че медът е ферментиран хранителен продукт от млечнокисели бактерии?

4. Идентифицирани са и други видове фруктофилни млечнокисели бактерии, защо не се съобщават и коментират?

Считам, че допуснатите неточности са нормални при написване, оформяне и защитаване на собствените резултати, изводи и приноси на първия самостоятелен труд на всеки докторант.

5. Публикации във връзка с дисертационния труд

Резултатите от настоящия дисертационен труд са отразени в три колективни научни статии, публикувани в пълен текст: J. Basic. Microbiology IF 2016-1,438 и J. BioSci. Biotechnol., глава от книга на английски език (реферирани в SCOPUS) и две участия в международни форуми. Всички публикации съдържат обобщени, анализирани данни от проведените експерименти в дисертацията.

6. Автореферат

Авторефератът отговаря на изискванията и отразява вярно и цялостно методите на изследване, получените резултати, изводи и научни приноси на дисертационния труд. Добре е структуриран и илюстриран с фигури и таблици.

7. Придобита компетентност и съответствие с изискванията на образователната и научна степен „доктор”

В хода на изпълнението на експерименталната работа и оформянето на дисертационния труд докторантът Явор Рабаджиев разширява своята теоретична компетентност, изгражда умения за работа със специализирана литература, да анализира и обобщава научната информация, да използва разностранни методи и техники, самостоятелно да оформя, дискутира и обобщава резултатите в изводи и заключения.

8. Заключение

Дисертационният труд представен от Явор Рабаджиев отговаря на изискванията на ЗРАСРБ, Правилника за неговото приложение и Правилника на СУ „Св. Кл. Охридски”.

Направените изводи и приноси ми дават основание убедително да гласувам положително и да препоръчам на Научното жури, сформирано със Заповед No РД-38-114/06.02.2018г на Ректора на СУ да присъди научната и образователна степен „доктор” по професионално направление 4.3. Биологични науки (Микробиология) на Явор Костадинов Рабаджиев

4.04.2018
София

Подпис:
(проф. д-н Н. Богацевска)