

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд, представен за защита по процедура за присъждане на образователна и научна степен “доктор” по професионално направление 4.3. „Биологически науки“ (Микробиология)

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

Автор: редовен докторант Явор Костадинов Рабаджиев

Научни ръководители: проф. дбн Искра Иванова и проф. д-р Илия Илиев

Рецензент: доц. д-р Траяна Недева

Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски”

Настоящата рецензия е изготвена в съответствие с нормативните документи – ЗРАС и ППЗРАС и Препоръките ФС на БФ за критериите при придобиване на научни степени, съобразени с тях.

1. Съвременно състояние на научния проблем и актуалност на дисертационната тема

Млечнокиселите бактерии (МКБ) играят важна роля в производството на храни и фуражи и се използват все повече като пробиотици, които подпомагат здравето. Непрекъснатият научен интерес към тези микроорганизми както от академичните изследователски групи, така и от индустрията доведе до много значими научни постижения и нови приложения, свързани с тях. През последните десетилетия сме свидетели на сериозен напредък в познанията ни за физиологията, биохимията и генетиката на тези микроорганизми, а от началото на XXI век – и на прилагането на "omics" техниките за по-задълбочено разбиране на молекулярната биология и приложния потенциал на МКБ. Понастоящем МКБ са индустриално важна група от бактерии, широко разпространени в природата и използвани в производството на ферментирани млечни продукти, във фармацевтичната индустрия, като пробиотици за подобряване на храненето и здравето.

Сред голямото разнообразие от МКБ, фруктофилните видове МКБ (ФМКБ) притежават специфични биохимични характеристики, които не са открити в представители, обитаващи други екологични ниши. ФМКБ са следвали специфичен еволюционен ход, за да се приспособят към богати на фруктоза местообитания и това предполага голям потенциал за бъдещи приложения за храни и фуражи. Богатите на фруктоза продукти като пчелен прашец, пчелно млечице и пчелен хляб се определят като здравословна храна и това определя научния интерес към ФМКБ от чревната флора на медоносните пчели.

Обект на дисертационния труд е изследване на видовото разнообразие на ФМКБ от местообитание ГИТ на медоносна пчела и проучване на техни специфични метаболитни характеристики. Темата е свързана с научното развитие на проблематиката за биохимичните особености и потенциал за приложение на ФМКБ. Тя

определено доказва актуалността на разработваната проблематика, постулираната научна хипотеза и методичен подход за доказването ѝ.

2. Оценка на структурата, специфичните задачи и тяхното съответствие с поставения научен проблем

Дисертационният труд е с обем 118 стр., от които основен текст 103 стр. и списък на използваните литературните източници – 9 стр. (121 заглавия), други приложения – 3 стр., (в т.ч. списък с използваните съкращения и справка за публикационната активност). Работата е структурирана по общоприетия за такъв вид труд схема, като включва част „Литературен отбор” (30 стр.); „Цел и задачи” и „Материали и методи” (15 стр.); „Резултати” (47 стр.), „Заключение” (5 стр.), „Изводи” и „Приноси”. Научните доказателства са добре илюстрирани с подходящи графики (24 бр.) и таблици (16 бр.). Съотношението на текст към илюстративен материал е приблизително 1:1, което е очаквано за една експериментална работа. Представени са 8 извода, 3 приноса; за обсъждане на резултатите са цитирани 90 автора на латиница.

Приложеният към основния труд Автореферат с обем 46 стр. основен текст е изготвен съгласно изискванията и отразява пропорционално и адекватно същността на дисертацията.

Специфичните задачи напълно съответстват на поставеният научен проблем. Те определят логична последователност от изследователски решения, които започват с изолиране на работен набор от ФМКБ, продължават с тяхното биохимично характеризирание и физиологична оценка при подбор на специфични условия на растеж, генетична идентификация и анализ на генната експресия и завършват с проучвания върху профила и свойствата на ключови ензими от вида *Lactobacillus kunkeei*, като завършващ етап на това комплексно научно изследване. Тези специфични задачи, чието изпълнение е реализирано с помощта на необходимия микробиологичен, ензимологичен и молекулярно-биологичен инструментариум са напълно достатъчни за постигане на ясно и коректно формулираната цел на труда.

3. Оценка на съответствието на методичните подходи с поставените цели

Използван е широк набор от методи, съобразени с конкретните изисквания на експерименталните задачи. Те включват микробиологични техники за изолиране, диференциране и култивиране на изследваните щамове; аналитични методи, свързани с физиологичната и биохимичната характеристика на културите, техники за получаване на безклетъчен екстракт, фракциониране и концентриране на екзоензими; ензимологични методи за определяне на активност на ключови ферменти, биосинтеза и анализ на екзополизахариди; електрофоретични анализи; молекулярни подходи, приложени за филогенетично охарактеризиране на изолираните ФМКБ и за проследяване на генна експресия на биосинтезираните от тях ензими, свързани с фруктозния метаболизъм. Този комплексен методичен подход (над 20 методи и тестове) е гаранция за провеждане на задълбочено проучване и разрешаване на научните задачи и за достоверност на формулираните изводи. В допълнение,

представянето на методичния подход позволява да се проследи последователно протокола за хода на изследователския процес. Независимо от факта, че липсват данни за използвани методи да оценка на коефициенти на вероятност и на корелация, декларираната от автора трикратна повтаряемост на всички експериментални данни дава основание за представяне на статистически достоверни резултати при сериозния обем аналитична работа.

4. Оценка на съответствието на теоретичната обосновка с експерименталните решения, резултати и приноси

Литературен обзор

Литературният обзор е написан въз основа на 113 заглавия на публикации от тематичния обхват на дисертацията. Те отразяват световните постижения и съвременни тенденции по научната проблематика – над 75% от цитираните публикации са излезли от печат след 2000 година. Тези данни показват, че авторът е приложил принципа на изчерпателност и библиографска точност, а така също се е съобразил с изискванията за актуалност на използваната информация. Същностно, той доста подробно описва състоянието на научния проблем, който включва преглед на физиологичната група МКБ и тяхното участие като основен компонент на флората на ГИТ на медоносната пчела. Специално внимание е отделено на системите за генна експресия на МКБ и анализ на генните продукти, с акцент върху индуцируемата от захари генна експресия и асоциираните с нея специфични транспортни механизми и транспортери. Всъщност, ABC транспортерните системи и в частност тези при микроорганизмите са засегнати доста подробно, което нарушава в известен смисъл баланса между отделните раздели на литературния обзор, но от друга страна обосновава необходимостта от проучване на оперирането им във ФМКБ. Последната част от литературния преглед представя информация относно функционирането на гликозилтрансферазните ензими в МКБ и тяхното значение за пробиотичния им ефект.

В литературния обзор докторантът представя достатъчно обширен и компетентен анализ на съвременното състояние на изследваните проблеми. Наблюдават се някои стилови неточности, които определено са с технически, а не същностен характер.

Експериментални решения, резултати и анализи

Получените резултати са представени и интерпретирани в подраздели, съответстващи на поставените задачи и са подредени в логическа последователност.

Като обект на изследванията се подбират 14 изолата ФМКБ, в резултат на специално аранжирана изолационна процедура, детайлите по която впрочем е редно да се опишат в раздел „Материали и методи“ а не в раздел „Резултати“. Така разработената схема за изолация на осмотолерантни ФМКБ в комбинация с данните от физиологичната им характеристика и въглехидратен профил позволява групирането на изолатите в 3 групи. Видовата идентификация на основата на въглехидратния профил е с недостатъчна достоверност. За прецизно характеризиране на изследваните щамове е определен техният ензимен профил с търговски кит, включващ анализ на 19 ключови

ензима от захарния, белтъчния, липидния метаболизъм, резултатите от които изследвания позиционират щамове в 5 групи. Всички те се определят като хетероферментативни на базата на анализ на крайните ферментационни продукти и определяне на активността на ключовите ензими ацетат киназа, лактат дехидрогеназа, фруктокиназа и алкохол дехидрогеназа при култивиране на фруктоза с нарастващи концентрации от 1 % до 30%. В допълнение на тези факти, наблюдаваните данни по отношение на повишените нива на ацетат и високите стойности на активността на ензимите фруктокиназа и ацетат киназа са основание за изказване на предположение за опериране на фосфокетолазния метаболитен път в посока получаване на фруктозо-6-фосфат и в последствие – ацетат. Докторантът представя допълнителни доказателства в подкрепа на това предположение с изследване на функционалната генна експресия и провеждане на допълнителни ензимни изследвания с *L. kunkeei* и *Fructobacillus* spp. Генетични изследвания по 16S рНК доказват присъствие на *L. kunkeei* в ГИТ на медоносните пчели (около 20% от изолираните щамове). Само в два от тези щамове са установени ключови ензими от въглехидратния метаболизъм и е доказан ефекта на високите концентрации на фруктоза върху изместване на ферментационните реакции в посока краен продукт ацетат.

Следващ етап от разработката е проучване на присъствието на разклоняващи захарози и установяването на такъв ензим в *L. kunkeei* щамове НЗ и Н25, факт който предполага биотрансформация на захарозата и фруктозата в олигозахариди с очакван пребиотичен ефект.

Така представените резултати са надлежно интерпретирани и обсъдени в светлината на известните литературни факти. Независимо, че коментираният раздел е озаглавен „Резултати“, де факто той заедно с раздела „Заклучение“ предлага задълбочена трактовка на експерименталните резултати и показва усвоените от докторанта умения да анализира и критично оценява наблюдавани факти. В този смисъл, по-коректно би било заглавието „Резултати и обсъждане“.

Резултатите са обобщени в 8 извода, които достоверно отразяват постиженията на представения докторантски труд. Повечето от изводите не представят количествени данни и имат констативен характер или са формулирани твърде общо. Липсват изводи по отношение на синтезата на полизахариди с установените гликозилтрансфери от изолати НЗ и Н25.

Приноси

Съгласно нормативните изисквания за присъждане на ОНС „Доктор“ дисертационният труд на Явор Рабаджиев съдържа резултати, представляващи оригинален принос в науката. Докторантът е формулирал три основни приноса с оригинален характер. Към тези основни оригинални постижения (твърде обобщени и нехронологично подредени) бих добавила и следните оригинални и потвърдителни приноси:

- Хипотезата за редуktivна еволюция на ФМКБ е потвърдена с помощта на ензимни тестове и функционална генна класификация;

- В изолираните щамове *L. kunkeei* се потвърждава оперирането на основни ензими от N-метаболизъм и разнообразно поведение по отношение на ензимите от въглехидратния метаболизъм;
- За първи път е доказано, че при *L. kunkeei* и *L. fallax* се наблюдава специфичност на разклоняването, катализирано от новооткритите екстрацелуларна и клетъчно-свързана глюкозилтрансферази, подобна на тази установена в *L. citreum*.

5. Предлагани допълнения и въпроси

Допълнения

Препоръки към основните раздели на дисертационния труд бяха отправени в изложението, по-горе. В работата се срещат някои стилови неточности (напр. понятията изразяване вместо експресия), неправилен словоред, правописни и пунктуационни грешки. Те са с технически, а не същностен характер и не повлияват съществено научната стойност на труда.

Въпроси

1. На каква база са подбрани представените на фиг. 13-16 четири щамове ФМКБ като представителни по отношение на растежа на глюкоза и фруктоза в ниска и висока концентрация?
2. Как бихте обяснили отсъствието на ключови ензими от въглехидратния метаболизъм във всички изолирани щамове ФМКБ, с изключение на AG8 AG9, независимо, че близо 20% от изолатите принадлежат на един и същи вид *L. kunkeei*?
3. Каква според Вас е причината за наблюдаваните разлики в експресионните нива на гена за ензима фруктокиназа в щамовете AG8 и AG9?

6. Публикации във връзка с дисертационния труд

Докторантът е публикувал части от резултатите на дисертационния труд в 2 научни списания с общ RG Journal Impact: 1.74. Явор Рабаджиев участва и в научния колектив, написал глава от книгата „Honey analysis”, публикувана от InTech. В две от публикациите докторантът е на първо или второ място, което определя неговия съществен дял в разработването на дисертационния труд. Към публикационната активност добавям и участието на докторанта на 2 национални научни форуми.

7. Съответствие на придобитата компетентност с изискванията на образователната и научна степен „доктор”.

Знания:

Докторантът е усвоил нови знания в конкретна научна област: изолиране и характеризирание на ФМКБ, физиологични, биохимични и генетични особености на тази физиологична група микроорганизми; механизми на фруктозния метаболизъм;

гликозилтрансферазна ензимна система, механизми за синтеза на полизахариди с помощта на гликозилтрансферази.

Умения:

Докторантът е придобил умения за прилагане на комплексен методичен подход за разрешаване на конкретни изследователски задачи. Той е усвоил съвременни микробиологични, аналитични, ензимологични и молекулярно-биологични методи. В допълнение на специализираните техники докторантът е придобил умения за анализ, интерпретация и оценка на експериментални данни, необходими за решаване на поставените в дисертационния труд проблеми. Тези умения са принос към съществуващите практики в професионалното направление.

Широка компетентност:

Докторантът демонстрира самостоятелност и професионализъм при разработването на новаторски идеи и научни изследвания в работен контекст; независимост и поемане на отговорност при разрешаване на научни проблеми, успешно адаптиране към работна среда и екип, усвояване на общи умения и нагласи, свързани с процеса на учене и самообучение.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Въз основа на посочените по-горе аргументи в подкрепа на актуалност на проблемите, обект на дисертационната работа, структура, специфични задачи за разрешаване на поставения научен проблем, методични подходи, експериментални решения, реализирани резултати и научни приноси, оценявам предоставения ми труд като дисертабилен и препоръчвам на почитаемото Научно Жури, назначено със Заповед № РД 38-14 / 06.07.2018 г., да присъди на **Явор Костадинов Рабаджиев** образователната и научна степен „доктор”.

04.04.2017 г.
София

рецензент:
(доц. д-р Траяна Недева)