БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ

ИНСТИТУТ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ „СТЕФАН АНГЕЛОВ“

ИНЖ. ЦВЕТАНКА ГЕНЧЕВА ТЕНЕВА-АНГЕЛОВА

Биоразнообразие от млечнокисели бактерии в лечебни растения и възможности за използване на биологичния им потенциал

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен

„Доктор“

професионално направление 4.3 „Биологически науки“ („Микробиология“)

Научен ръководител:

доц. д-р Дора Миленова Бешкова

София, 2018

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ

ИНСТИТУТ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ „СТЕФАН АНГЕЛОВ“

ИНЖ. ЦВЕТАНКА ГЕНЧЕВА ТЕНЕВА-АНГЕЛОВА

Биоразнообразие от млечнокисели бактерии в лечебни растения и възможности за използване на биологичния им потенциал

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“

професионално направление 4.3 „Биологически науки“ („Микробиология“)

Научен ръководител:
доц. д-р Дора Миленова Бешкова

Научно жури:
доц. д-р Светла Трифонова Данова, дбн
доц. д-р Дора Миленова Бешкова
проф. д-р инж. Вяра Николаева Иванова
проф. д-р Искра Витанова Иванова, дбн
проф. д-р Илия Николов Илиев

Дисертационният труд е представен на 189 стандартни машинописни страници и съдържа 33 фигури и 16 таблици. Библиографската справка включва 271 литературни източника.
Дисертантът работи в Институт по Микробиология „Стефан Ангелов“, департамент „Приложна микробиология“, Лаборатория по приложни биотехнологии.
Изследванията, свързани с дисертационния труд, са проведени в Лабораторията по приложни биотехнологи, Институт по микробиология „Стефан Ангелов”, БАН. Генетичната идентификация е извършена в Лаборатория Валенберг, Гьотеборгски университет, Швеция.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на разширено заседание на Националния семинар по Приложна микробиология и микробни биотехнологии към Институт по микробиология на БАН, състяло се на 18.01.2018 г. Защитата на дисертационния труд ще се състои на ..... от ..... часа в залата на Институт по микробиология “Стефан Ангелов”, БАН, ул. „Акад. Г. Бончев”, бл. 26, София.
Материалите по защитата са на разположение в кабинета на научния секретар на Институт по микробиология „Стефан Ангелов”, БАН, ул. „Акад. Г. Бончев”, бл. 26, София.

БЛАГОДАРНОСТИ:

Изказвам искрена благодарност на научния ми ръководител доц. д-р Дора Бешкова за помощта, съветите и напътствията при изработването на настоящия дисертационен труд, както и за създадената благоприятна работна атмосфера.

На доц. д-р Гинка Френгова за помощта и насоките, които ми даваше по време на изработването на дисертационния труд.

На технолог Светла Костадинова за помощта, която ми оказваше по време на изработването на експерименталната част от дисертацията.

На чл.-кор. дтн Атанас Павлов, доц. д-р Васил Георгиев и на целия екип на Лаборатория по приложни биотехнологии, Пловдив – за подкрепата, помощта, практическите съвети и за чудесната работна обстановка и съвместна работа.

На гл.ас. д-р Радка Вранчева (Катедра „Аналитична химия“, УХТ-Пловдив) за професионалната подкрепа и насоки.

Не на последно по важност място – благодаря на моя съпруг за разбирането, безрезервната подкрепа и помощта при изработването на дисертационния труд. Благодаря на цялото ми семейство за обичта, разбирането, подкрепата и сила, които ми даваха през годините.

Благодаря ви!

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

МКБ	млечнокиселите бактерии
GRAS	Generally Recognized As Safe, Общо признати като безопасни
РНК	рибокуклеинова киселина
АТР	аденозинтрифосфат
ЕМП	Ембден - Майерхоф - Парнас
LDH	лактат дехидрогеназа
NAD	никотинамид аденин динуклеотид
PTS	фосфотрансферазна системата
Opp	олигопептидна транспортна система
AA	аминокиселина
DtrT/DtrP	дипептид/ трипептид транспортьори
ДНК	дезоксирибонуклеиновата киселина
PFGE	pulsed-field gel electrophoresis, пулсова гел електрофореза
RAPD	randomly amplified polymorphic DNA
AFLP	amplified fragment length polymorphism
ARDRA	amplified ribosomal DNA restriction analysis
PCR	polymerase chain reaction, полимеразно-верижна реакция
Rep-PCR	repetitive extragenic palindromic PCR
TAP-PCR	triplicate arbitrary primed PCR
NCBI	National Center for Biotechnology Information, Национален център за биотехнологична информация
INSDC	International Nucleotide Sequence Database Collaboration, Международно сътрудничество за база данни на нуклеотидни секвенци
±SD	стандартно отклонение
K-DLATE	лактат дехидрогеназен кит
EDTA	етилендиамин тетра оцетна киселина
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
HPLC	High-performance liquid chromatography, високо ефективна течна хроматография
UV	ултравиолетова светлина
VIS	видима светлина
GAE	еквиваленти галова киселина
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, 1,1-дифенил-2-пикрилхидразил радикал
TE	Тролокс еквиваленти
ABTS	2,2'-azino-bis (3)-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid, 2,2' азинобис(3)-етилбензтиазолин-6-сулфонова киселина
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power, желязо редуцираща антиосидантна активност
TPTZ	2,4,6-tripyridyl-s-triazine, 2,4,6-трипиридил-s-триазин
CUPRAC	Cupric ion Reducing Antioxidant Capacity, мед редуцираща актиоксидантна активност
MRS	De Man, Rogosa and Sharpe (селективна среда)
M17	M17 (селективна среда)
CFU	Colony-forming unit (колонии образуващи единици)
Mega	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
МК	млечна киселина
pH	активна киселинност
CE	сух екстракт

ВЪВЕДЕНИЕ

Използването на млечнокиселите бактерии (МКБ) за ферментация на различни храни датира още от около 6000 г. пр. Хр., като по този начин се поставя началото на един от най-старите методи, използвани някога за консервиране на храни, познати на хората.

МКБ са широко разпространени микроорганизми, които могат да бъдат открити в различни екосистеми и продукти, като растения, ферментирали храни и части от човешкото тяло.

През последните години нараства интересът към млечнокисели бактерии, изолирани от не-млечна среда, тъй като те проявяват голямо метаболитно разнообразие и имат уникални вкусово-формиращи активности. Свидетели сме на непрекъснати предизвикателства за промяна на хранителното търсене чрез използване на нови хранителни компоненти и стартерни съобщества, изолирани от природното биоразнообразие и носители на специфични здравни ползи и/или на нови сензорни характеристики.

Търсенето на нови решения за усъвършенстване на стартерните системи за здравословни храни (ферментирали млека) и за разширяване на възможностите за най-пълно използване на биологичния потенциал на млечнокиселите бактерии е предпоставка за експлоатиране на биоразнообразието в уникални природни биосистеми (лечебни растения). Всеки определен растителен вид осигурява уникална обкръжаваща среда от гледна точка на конкурентни микроорганизми, природни растителни антагонисти, вид, достъпност и концентрация на субстрат и различни физични фактори. Тези условия позволяват развитието на характерна епифитна флора, от която произлиза популация и верига от ферментационни микроорганизми, когато растителният материал е събран и подготвен за ферментация. Определени видове млечнокисели бактерии се срещат последователно върху различни растения, индикиращи, че растенията са природни хабитати на млечнокиселите бактерии.

Млечнокиселите бактерии притежават GRAS (Generally Recognized As Safe) статус. Те са важни за млечната индустрия и са от съществено значение за производството на редица традиционни и нови млечни продукти. Добре известна е способността на МКБ да продуцират различни биологичноактивни метаболити, носители на активности, водещи до здравословния ефект на ферментиралите млечни храни.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

ЦЕЛ: Изследване на биоразнообразието на млечнокисели бактерии в медицинските растения *Geranium sanguineum* L., *Hypericum perforatum* L., *Panax ginseng* C.A.Meyer, *Salvia officinalis* L., *Salvia ringens* Sibth. & Sm., *Salvia blepharophylla* Brandegee ex Epling, *Salvia scabiosifolia* Lam. и *Salvia tomentosa* Mill. и оценка на биологичния потенциал на млечнокиселите бактерии.

ЗАДАЧИ:

1. Изолиране и характеризиране на млечнокисели бактерии от медицинските растения *G. sanguineum* L., *H. perforatum* L., *P. ginseng* C.A.Meyer, *S. officinalis* L., *S. ringens* Sibth. & Sm., *S. blepharophylla* Brandegee ex Epling, *S. scabiosifolia* Lam. и *S. tomentosa* Mill.:
   1.1. Събиране на растителния материал
   1.2. Изолиране на бактериални изолати, принадлежащи към групата на млечнокиселите бактерии
   1.3. Морфологична, физиологична и биохимична характеристика на чисти култури млечнокисели бактерии от лечебни растения
2. Видова идентификация на млечнокисели бактерии от растителен произход, съгласно съвременната полифазна таксономия
3. Характеристика на екстракти от *G. sanguineum* L., *H. perforatum* L., *P. ginseng* C.A.Meyer, *S. officinalis* L.
   3.1. Анализ на полифенолния профил на получените екстракти чрез HPLC анализ
   3.2. Определяне съдържанието на общи фенолни съединения и анализ на антиоксидантна активност
4. Устойчивост на растителните млечнокисели бактерии към екстракти от изследваните растения
5. Ферментационни и растежни характеристики на млечнокисели бактерии от растителен и млечен произход при култивиране в мляко

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Събиране на растителния материал - обект на нашите изследвания са медицинските растения: *Geranium sanguineum* L., *Hypericum perforatum* L., *Panax ginseng* C.A.Meyer и 5 растителни вида, принадлежащи към род *Salvia* (*S. scabiosifolia* Lam., *S. ringens* Sibth. & Sm, *S. officinalis* L, *S. tomentosa* Mill., *S. blepharophylla* Brandegee ex Epling). Растителният материал е събиран по време на цъфтеж през месеците май и юни от различни находища. Пробите са събирани в стерилни епруветки и транспортирани до лабораторията за анализ.

2. Изолиране на МКБ - отделни части (цвят, листо и стъбло) от всеки растителен вид са трансферирани в 12% възстановено стерилно обезмаслено мляко, инкубирани при 30 ºC и 37 ºC, до коагулация на млякото. Последващо са трансферирани в селективни среди - M17 и MRS, с добавен циклохексимид и култивирани при 30 ºC и 37 ºC и анаеробни условия, до получаване на единични колонии. Получените бактериални изолати са съхранявани в течни MRS и M17 среди, съдържащи 15% глицерол при -80 ºC за следващи изследвания.

3. Идентификация на млечнокисели бактерии

3.1. Морфологични, физиологични и биохимични характеристики – на бактериалните изолати са направени тестове за потвърждаване принадлежността им към групата на МКБ (оцветяване по Грам, каталазен тест, оксидазен тест, реакция за индол); определена е морфологията на клетките (Micros Pink MC50, Austria) и на колониите (CETI, Digi Steddy II, Belgium); продуциране на млечна киселина - чрез лактат дехидрогеназен кит K-DLATE 12/12 (Megazyme); изследвана е способността им за развитие при различни температури (4, 15, 30, 37, 45 и 55 ºC), различно pH (3.0, 5.0, 7.0, 8.0 и 9.6) и степента им на халотолерантност (NaCl - 3.0, 4.5, 6.5, 8.5 и 10.0%). Бактериалните изолати са сравнени с МКБ, изолирани от млечни продукти, принадлежащи на колекцията на Лаборатория по приложни биотехнологии: *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* LD5, *Streptococcus thermophilus* ST3, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* LL3, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* LC1, *Enterococcus faecium* EF4, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* LB1-9 и *Lactobacillus rhamnosus* LR2.

Първоначалната идентификация на селектираните бактериални изолати, на база изследван въглехидратен метаболизъм и ензимни реакции, е извършена с помощта на API 50 CHL и API 20 STREP тестове (BioMerieux, France).

3.2. Генотипно характеризиране

3.2.1. Изолиране на геномна ДНК – с NucleoSpin® Soil Kit (Macherey-Nagel, Germany)

3.2.2. PCR анализ, агарозна гел електрофореза и 16S рДНК секвенционен анализ - за амплифицирането на фрагменти от 16S рДНК са използвани универсални праймери 27F и 1492R. Секвенираниранетo е извършено от Eurofins MWG Operon LLC (Ebersberg, Germany).

4. Биологично активни вещества и антиоксидантна активност на екстракти от *Salvia officinalis* L., *Hypericum perforatum* L., *Panax ginseng* C.A.Meyer и *Geranium sanguineum* L.

4.1. Растителен материал - растителният материал от *Salvia officinalis* L. (листа), *Geranium sanguineum* L. (корен), *Hypericum perforatum* L. (листа) е събран от техните

естествени местообитания, промит, изсушен, смлян и използван за екстракция. Растителният материал от *Panax ginseng* C.A.Meyer (корен, смлян) е закупен от търговската мрежа и директно е използван за екстракция.

4.2. Получаване на груби екстракти - 100 g от смляния на прах растителен материал е екстрахиран (трикратно) с 70% етанол (1:10 w/v) за 24 h на стайна температура. Екстрактите са събирани, филтрувани, концентрирани на вакуум изпарител и лиофилизирани. Лиофилизираните екстракти са разтворени в 30% етанол и във вода и филтрувани през филтър (0.22 μm).

4.3. Анализ на биологично активни вещества чрез високоефективна течна хроматография (HPLC) - анализ за определяне на полифенолни съединения (фенолни киселини и флавоноиди) - използвана е Waters HPLC система и UV-VIS детектор.

4.4. Определяне на съдържанието на общи фенолни съединения и антиоксидантна активност чрез спектрофотометрични методи

4.4.1. Съдържание на общи фенолни съединения - анализирани са по метода на Folin-Ciocalteu.

4.4.2. Определяне на антиоксидантна активност – определена е по методите DPPH, ABTS, FRAP и CUPRAC.

5. Определяне на устойчивостта на идентифицираните млечнокисели бактерии от растителен произход към характеризираните растителни екстракти - използван е класическият агар дифузионен метод. Изследвани са различни концентрации (0.01 – 500 mg/ml) от растителните екстракти. Отчетено е наличието или отсъствието на зони на инхибиране, както и съответните концентрации на растителните екстракти, които влияят или не върху растежа на МКБ. Получените резултати са представени като концентрация на растителния екстракт (mg/ml), която не инхибира растежа на МКБ. Всички тестове са проведени в трикратно повторение. Изследвана е и инхибиращата способност на растителните екстракти върху развитието на МКБ (*S. thermophilus* ST3, *Lc. Lactis* LL3, *E. faecium* EF4, *Lb. rhamnosus* LR2), с млечен произход.

6. Ферментационни и растежни характеристики на млечнокисели бактерии от растителен и млечен произход при култивиране в мляко - МКБ от растителен и млечен произход (*S. thermophilus* ST3, *Lc. lactis* LL3, *E. faecium* EF4 и *Lb. rhamnosus* LR2) са култивирани в 12% сухо обезмаслено мляко, при оптимални температури за растеж (за съответните МКБ) и инокулум 10^6 CFU/g за *S. thermophilus* и 10^7 CFU/g за *Lc. lactis*, *E. faecium*, *E. mundtii*, *E. casseliflavus* и *Lb. rhamnosus*, до момента на коагулация на млякото.

Определяне на броя на жизнеспособни микроорганизми – чрез повърхностен посев на агаризирани среди. Концентрацията на жизнеспособните клетки е изразена като CFU/g.

Определяне концентрацията на остатъчна лактоза – използвана е Shimadzu HPLC система и рефрактометричен детектор.

7. Използван софтуер и статистическа обработка на данните

Данните са представени като средна стойност от три независими експеримента, проведени в трикратна повторяемост (n=9) и стандартно отклонение (SD). За оформянето на резултатите са използвани програми Microsoft Excel 2016 (Microsoft,

Redmond, USA), Microsoft Word 2016 (Microsoft, Redmond, USA), Breeze TM 3.30 (Waters, Ireland), LC solution v. 1.24SP1 (Shimadzu, Japan), API web version 1.1.0, BioEdit (Tom Hall, Ibis Therapeutics, Carlsbad, CA, USA), Mega 4.1 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Tamura et al., 2007).

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Събиране на растителния материал

Медицинските растения, необходими за разработването на настоящия дисертационен труд (*Geranium sanguineum* L., *Hypericum perforatum* L., *Panax ginseng* C.A.Meyer, *Salvia officinalis* L., *Salvia ringens* Sibth. & Sm., *Salvia blepharophylla* Brandegee ex Epling, *Salvia scabiosifolia* Lam. и *Salvia tomentosa* Mill. са събирани от екологични райони на местообитанието им. Растителният материал е събран през месеците май и юни, по време на цъфтежа им. За изолирането на млечнокисели бактерии е използвана надземната част на растенията.

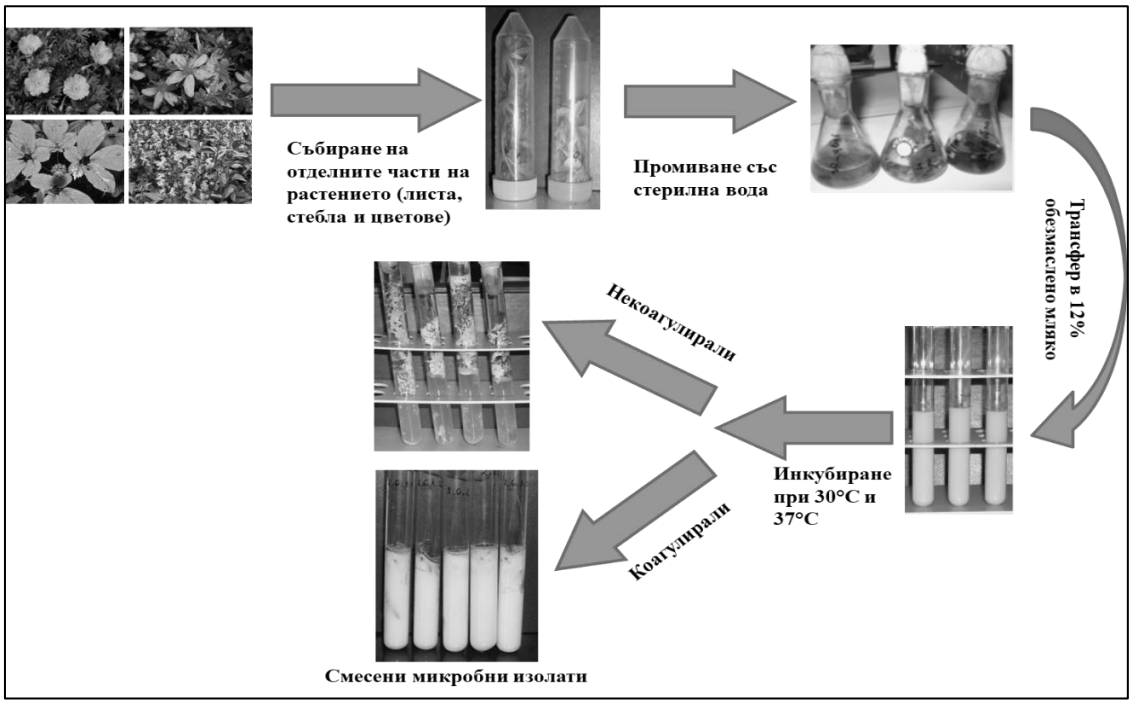
2. Изолиране и характеризиране на млечнокисели бактарии от медицински растения

2.1. Изолиране на бактериални изолати, принадлежащи към групата на млечнокиселите бактарии

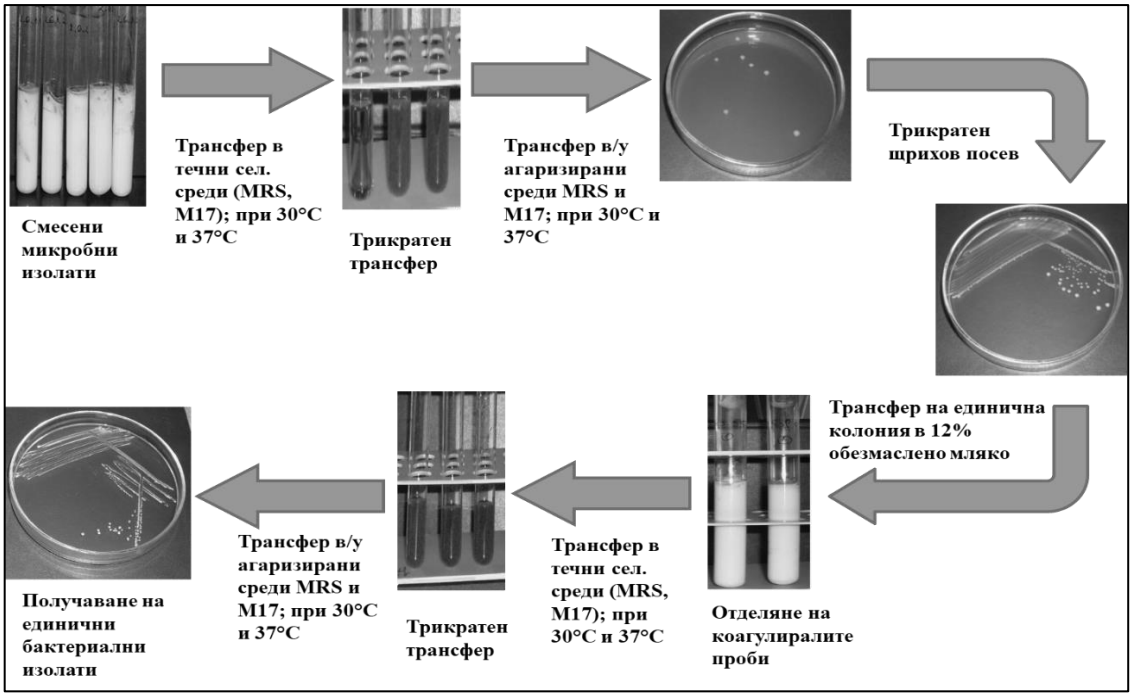
На фиг. 1 (7*) са представени стъпките за изолиране на единични бактериални изолати (принадлежащи към МКБ) от изследваните медицински растения.

В резултат на широкомащабен скрининг на 800 микробни изолата (получени от цвят, листо или стъбло на 5 вида *Salvia* – *S. officinalis* L., *S. ringens* Sibth. & Sm., *S. blepharophylla* Brandegee ex Epling, *S. scabiosifolia* Lam., *S. tomentosa* Mill.), 300 микробни изолата (от *G. sanguineum* L.), и по 50 микробни изолата (съответно от *H. perforatum* L. и *P. ginseng* C.A.Meyer), на база визуална оценка за коагулация на мляко, отделяне на газ и неспецифичен аромат, от всички изследвани растения са селектирани общо 188 броя смесени микробни култури (23.50%), които образуват твърд коагулум, не отделят газ и нямат неспецифичен аромат.

След последващи многократни трансфери и развитие на селективни среди M17 и MRS, от всички изследвани растения са изолирани 718 единични бактериални колонии, които в последствие са идентифицирани посредством класическите техники за доказване на фенотипната им характеристика и съответната им принадлежност към групата на МКБ. Данните от проведените задължителни и потвърждаващи тестове (оцветяване по Грам, каталазен тест, оксидазен тест, реакция за индол) установиха, че 21.45%, т.е. 154 броя единични колонии показват идентичност с групата на МКБ.



А



Б

Фиг. 1 (7*) Схема за изолиране на бактериални изолати от *G. sanguineum* L., *H. perforatum* L., *P. ginseng* C.A.Meyer, *S. officinalis* L., *S. ringens* Sibth. & Sm., *S. blepharophylla* Brandegee ex Epling, *S. scabiosifolia* Lam. и *S. tomentosa* Mill. А – получаване на смесени микробни култури (първичен скрининг), Б – получаване на единични бактериални изолати (принадлежащи към МКБ)
*** - номерация от дисертацията**

Те са Грам-положителни, каталазо-отрицателни, оксидазо-отрицателни и индол-отрицателни. На таблица 1 (5) са представени броят на смесените микробни култури и изолираните единични бактериални изолати, от отделните изследвани растения, преди и след първоначалните тестове.

Цветовете на растенията от род *Salvia* се оказаха най-предпочитаната част за обитаване от млечнокисели бактерии (32 броя единични бактериални изолата), следвани от листата (15 броя) и стъблата (9 броя). Единствено от вида *S. tomentosa* Mill. не са изолирани МКБ, а най-голям брой (25) са изолирани от *S. ringens* Sibth. & Sm. МКБ не са изолирани също и от *S. officinalis* L., от местностите в района на Източните Родопи. При *G. sanguineum* L. се наблюдава същата тенденция, цветовете са най-предпочитаната част от растението (37 броя единични изолата), следвани от листата (25 броя), а от стъблото не са изолирани представители на МКБ. От *H. perforatum* L. са изолирани бактериални изолати, показващи идентичност с групата на МКБ, единствено от цветовете (11 броя), а от *P. ginseng* C.A.Meyer – от листата на растението (25 броя).

Таблица 1 (5). Брой смесени микробни култури и единични бактериални изолати, получени от *G. sanguineum* L., *H. perforatum* L., *P. ginseng* C.A.Meyer, *S. officinalis* L., *S. ringens* Sibth. & Sm., *S. blepharophylla* Brandegee ex Epling, *S. scabiosifolia* Lam. и *S. tomentosa* Mill.

Растителни видове	Смесени микробни култури [1]	Смесени микробни култури [2]	Единични бактериални изолати [3]	Единични бактериални изолати [4]
S. officinalis	300	31 (10.33%)	164	10 (6.10%)
S. ringens	300	52 (17.33%)	146	25 (17.12%)
S. blepharophylla	80	19 (23.75%)	55	7 (12.73%)
S. scabiosifolia	20	12 (60.00%)	74	14 (18.92%)
S. tomentosa	100	10 (10.00%)	21	0
G. sanguineum	300	43 (14.33%)	169	62 (36.69%)
H. perforatum	50	8 (16.00%)	30	11 (36.67%)
P. ginseng	50	13 (26.00%)	59	25 (42.37%)
ОБЩО	**1200**	**188 (23.50%)**	**718**	**154 (21.45%)**

[1] получени след първоначалното поставяне на растителните части в мляко;
[2] получени след първичен скрининг;
[3] получени след трансфер на селективни среди;
[4] получени след тестовете за доказване на принадлежност към групата на МКБ;

В абревиатурата на изолираните млечнокисели бактерии, от съответните растителни проби, са включени: инициали на съответния растителен вид; инициал за частта на растението, от което е изолирана; индекс, обозначаващ местонахождението на растителния вид или инициал на близкостоящо населено място, до съответните райони за България, както и съкратено изписване на Германия; номер на колонията. Например GsfIV123: Gs – *Geranium sanguineum*, f – цвят (flower), IV - Ивайловград, 123 – номер на колонията.

В заключение, от надземната част (цвят, листо, стебло) на изследваните медицински растения, от различни находища, са изолирани 154 броя единични бактериални изолата, принадлежащи към групата на МКБ (Грам-положителни, каталазо-отрицателни, оксидазо-отрицателни и индол-отрицателни). От *S. officinalis* L., *S. ringens* Sibth. & Sm., *S. blepharophylla* Brandegee ex Epling, *S. scabiosifolia* Lam. са изолирани 56 бактериални изолата, от *G. sanguineum* L. – 62 изолата, от *H. perforatum* L. – 11 изолата и от *P. ginseng* C.A.Meyer – 25 изолата. От *S. tomentosa* Mill., както и от *S. officinalis* L., събрана от района на Източните Родопи, не са изолирани единични бактериални изолати, принадлежащи към групата на МКБ. Най-много единични

бактериални изолати са изолирани от цветовете на растенията (80 броя единични бактериални изолата), последвани от листата (65 броя) и стъблата (9 броя).

2.2. Морфологична, физиологична и биохимична характеристика на единични бактериални изолати, показващи фенотипна идентичност с групата на МКБ, изолирани от лечебни растения

2.2.1. Морфологична характеристика

Единичните бактериални изолати, изолирани от изследваните медицински растения, първоначално са морфологично, физиологично и биохимично характеризирани. Всичките изолати са Грам-положителни, каталазо-отрицателни, оксидазо-отрицателни, индол-отрицателни. Те са морфологично дефинирани, като клетки с коковидна и пръчковидна форма. От *G. sanguineum* L., *H. perforatum* L. и от четирите вида *Salvia* са изолирани коковидни бактерии, докато от *P. ginseng* C.A.Meyer – пръчковидни бактерии.

Коките, изолирани от представителите на род *Salvia*, са разположени по единично, по двойки, в къси или дълги верижки, с големина на клетките от 0.3 µm до 2.0 µm. Всички показват блестящ тип на съответните колонии, с голямо разнообразие на цвят (бял, светло бежов и жълт), форма (кръгла - изпъкнала или плоска, с гладък или вълнообразен ръб) и размер (от 1.1 mm до 3.1 mm).

Изолираните от *G. sanguineum* L. бактерии с коковидна форма са разположени по единично, по двойки, в къси или дълги верижки и в струпвания. Размерът на клетките е от 0.8 µm до 2.9 µm. Колониите са с блестяща повърхност, бели и светло бежови на цвят, формата им е кръгла, изпъкнала, с гладък и вълнообразен ръб, а размерът им е от 0.5 до 2.5 mm. При тях не се наблюдава голямо морфологично разнообразие.

От *H. perforatum* L. са изолирани бактерии с коковидна форма със сходна морфологична характеристика. Клетките са разположени по единично, по двойки, в къси верижки, с размер от 1.2 µm до 1.9 µm. Колониите са бели, с блестяща повърхност, с кръгла, изпъкнала формата и гладък ръб, а размерът им е от 2.1 до 2.6 mm.

Бактериите с пръчковидна форма, изолирани от *P. ginseng* C.A.Meyer са разположени по двойки, в къси и дълги вериги, а големината на клетките има следните размери (1.4÷2.8)x(0.3÷1.0) µm. Всички колонии са с блестяща повърхност, с бял и мръсно бял цвят, формата на колонията е кръгла, с изпъкнал ръб и гладки крайща и с големина от 1.0 mm до 2.1 mm.

2.2.2. Определяне на изомерните форми и концентрацията на продуцираната млечна киселина

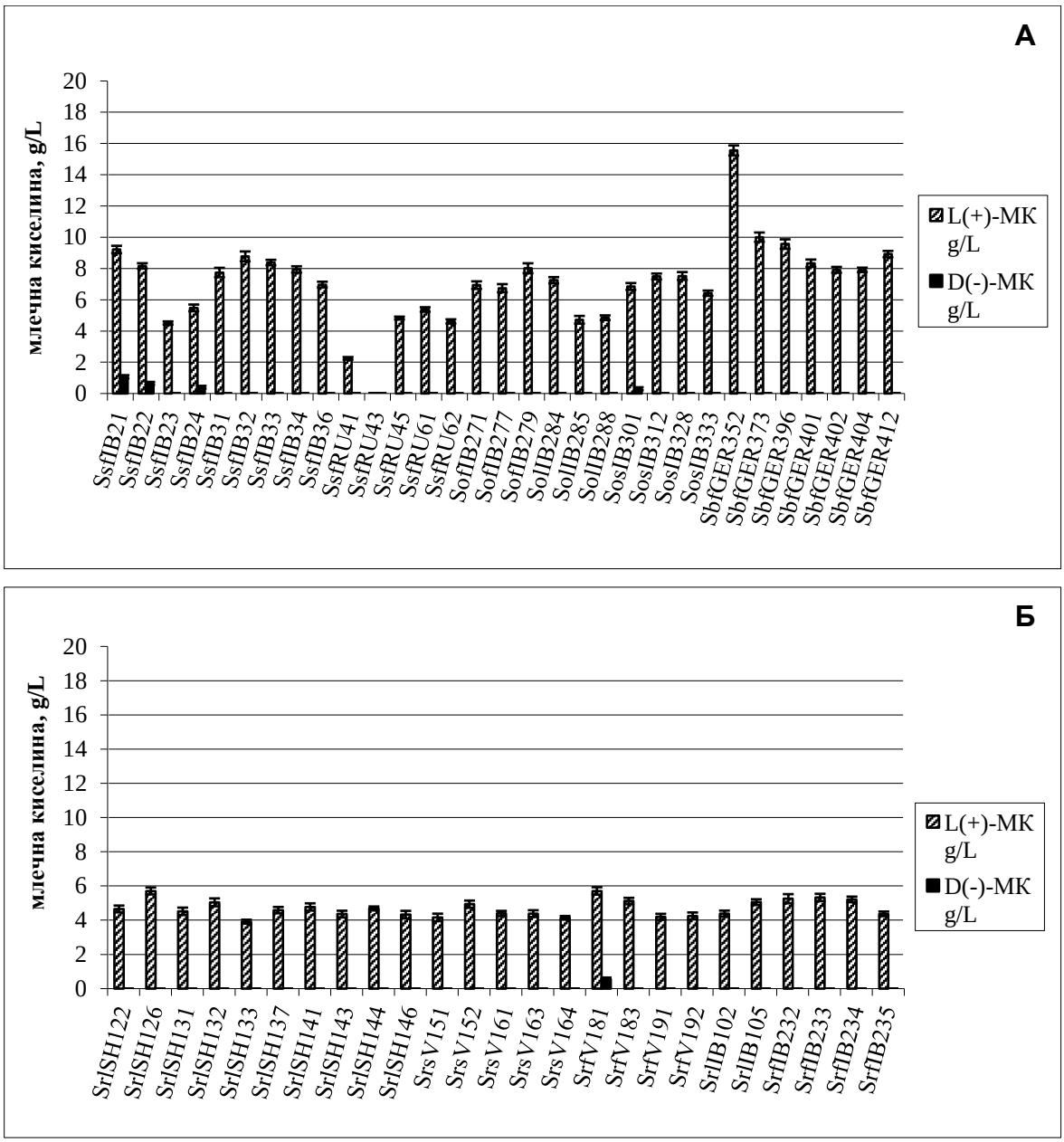
Данните за изомерните форми на продуцираната млечна киселина (МК), от изследваните растителните МКБ, показват, че 85.45% синтезират L(+)-МК и 14.55% D(-)/L(+)-МК (Фигури 2 (9), 3 (10), 4 (11) и 5 (12)). Коките, изолирани от *H. perforatum* L. и пръчиците от *P. ginseng* C.A.Meyer синтезират само L(+)-МК. Сред анализираните изолати от *G. sanguineum* L. и от различните видове *Salvia* има представители, синтезиращи, както само L(+)-МК, така и D(-)/L(+)-МК. Освен това в изолатите, продуциращи двете изомерни форми на млечната киселина, доминиращо е присъствието на L(+). Изключение прави само изолат GslIV213 (изолиран от *G. sanguineum* L.), който синтезира 6.17 g/L D(-)-МК и по-малко количество L(+)-МК. Липсват представители, продуциращи само D(-)-МК.

При изолатите, изолирани от представители на род *Salvia,* с най-висока активност за синтез на млечна киселина са изолатите, получени от *S. blepharophylla*, с

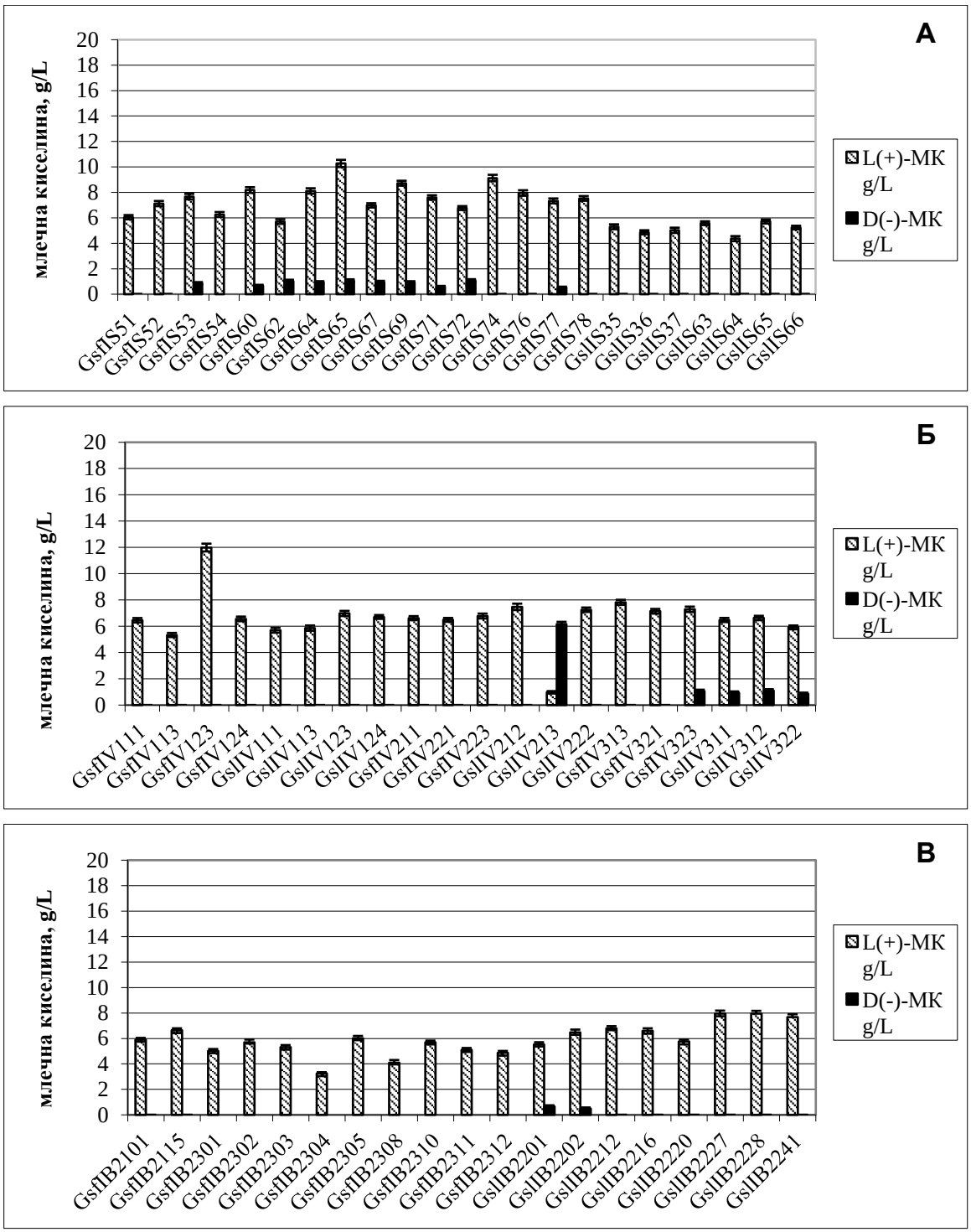
достигнати максимални концентрации от 10.01 g /L и 15.56 g/L (фиг. 2А (9А)). 50% от изолатите от *S. scabiosifolia* и 80% от изолатите от *S. officinalis* също показват висока киселинопродуцираща активност, с концентрации на млечна киселина в интервала 7.74 g/L – 10.29 g/L и 6.42 g/L – 8.02 g/L, респективно (фиг. 2А (9А)). Сравнително по-ниски концентрации на млечна киселина (около 4.00 g/L – 5.00 g/L) са определени при изолатите от *S. ringens* (фиг. 2Б (9Б)). С най-висока активност за синтез на млечна киселина, от изолатите от *G. sanguineum* L., са GsfIV123 и GsfIS65, с достигнати максимални концентрации от 11.99 g /L и 10.27 g/L (фиг. 3 (10)) Една трета от изолатите от *G. sanguineum* L. също показват висока киселинопродуцираща активност, с концентрации на млечна киселина над 7.00 g/L (фиг. 3 (10)). Сравнително по-ниски концентрации на продуцираната млечна киселина, в интервала 3.87 g/L – 7.34 g/L, са определени при другите изолати с коковидна форма от *H. perforatum* L. (фиг. 4 (11)). Най–висока киселинопродуцираща активност, от изолатите с пръчковидна форма, от *P. ginseng* C.A.Meyer, показва изолат PglGER1 (9.36 g/L), докато останалите изолати синтезират млечна киселина в по–ниски концентрации (3.50 – 7.00 g/L) (фиг. 5 (12)).

Установените концентрации на млечна киселина, синтезирани от селектираните млечнокисели бактерии от растителен произход, са съпоставими с тези, продуцирани от наличните в колекцията на изследователския колектив МКБ, изолирани от млечни продукти - *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* LD5 – 10.00 g L(+)/L, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* LL3 – 8.08 g L(+)/L, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* LC1 – 7.47 g L(+)/L, *Streptococcus thermophilus* ST3 – 9.39 g L(+)/L, *Enterococcus faecium* EF4 – 4.15 g L(+)/L, *Lactobacillus rhamnosus* LR2 – 10.51 g L(+)/L, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* LB1-9 – 19.00 g D(-)/L.

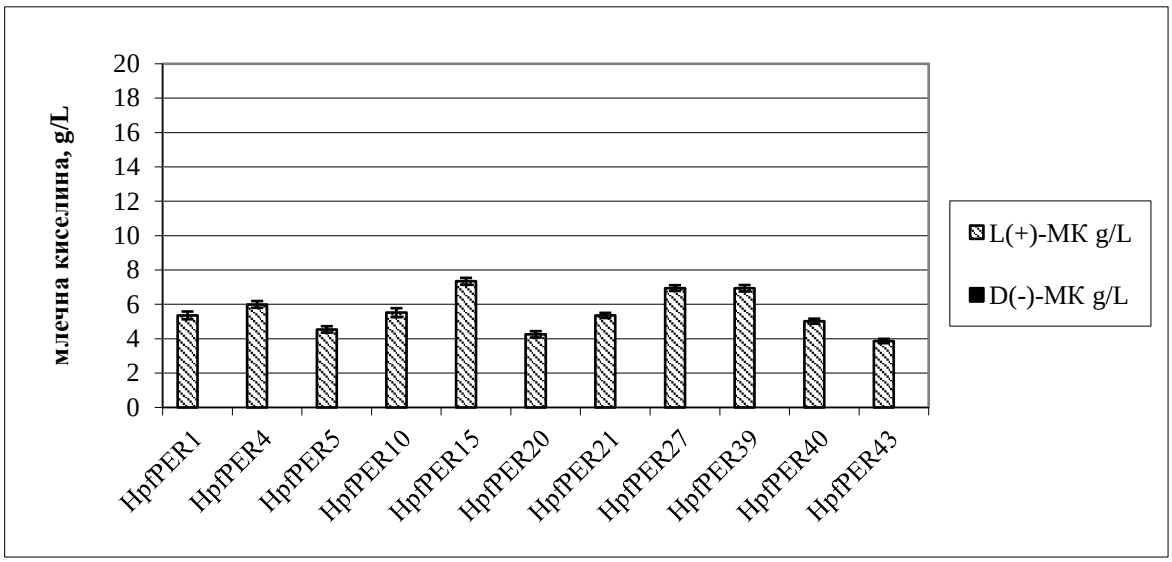
Подобни резултати се съобщават и от Kimoto et al. (2004), които са получили 20 бактериални изолата от вид трева в Япония (napiergrass), впоследствие морфологично дефинирани като коки, продуциращи само L(+)-МК. Kostinek et al. (2007) също са изолирали коки и пръчки от ферментирала касава, продуциращи L(+)-МК. Пръчковидни бактерии, продуциращи същия изомер са изолирани и от ферментирали чаени листа (miang) в Тайланд (Tanasupawat el al., 2007). Последните автори, са изолирали и коки, продуциращи D(-)/L(+)-МК, доказани също и от Tamang et al. (2005) за педиококи от традиционни ферментирали зеленчукови продукти, от региона на Източните Хималаи. За разлика от нашите данни, Tanasupawat el al. (2007) и Tamang et al. (2005) са изолирали пръчковидни бактерии, продуциращи D(-)/L(+)-МК, а Kostinek et al. (2007) съобщават за пръчковидни бактерии, синтезиращи както D(-)-МК и L(+)-МК, така и D(-)/L(+)-МК. От посочените растителни източници са изолирани и коки, продуциращи само D(-)-МК (Kostinek et al., 2007; Tamang et al., 2005), както и пръчковидни бактерии, продуциращи D(-)/L(+)-МК (Tanasupawat et al., 2007; Kostinek et al., 2007). Освен определяне на изомерните форми на синтезираната МК от бактериални изолати, като елемент от тяхната предварителна идентификация, някои автори съобщават данни и за концентрациите на млечната киселина. В тази връзка, интерес представляват резултатите, съобщени от Cock and De Stouvenel (2006), които на база скрининг на 20 бактериални изолата, получени от листа на захарна меласа, са селектирали само един щам (CC 85-92) с висок потенциал за синтез на L(+)-МК, в концентрации 12.4 g/L и 13.7 g/L, респективно при 36 ^{o}C и 32 ^{o}C температури на култивиране. С този щам, култивиран при параметри, подходящи за целенасочен синтез на млечна киселина, авторите са достигнали максимален добив от 35.0 g/L.



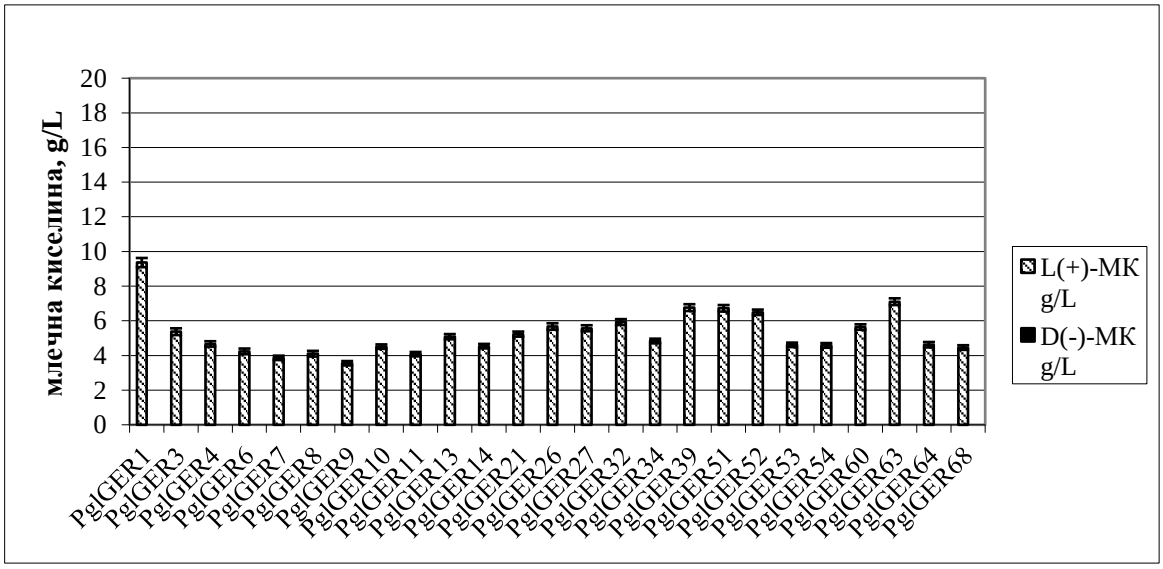
Фиг. 2 (9) Продуциране на млечна киселина от МКБ, изолирани от видове *Salvia*: А – *S.scabiosifolia* Lam. (Ss), *S. officinalis* L. (So), *S. blepharophylla* Brandegee ex Epling (Sb); В – *S.ringens* Sibth. & Sm. (Sr). Данните представляват средна стойност ±SD



Фиг. 3 (10) Продуциране на млечна киселина от МКБ, изолирани от *G. sanguineum* L. събрани от: А - район Витоша (язовир Искър); Б - Източни Родопи (Ивайловград); В - Софийски район (експериментално поле на ИБЕИ – БАН. Данните представляват средна стойност ±SD



Фиг. 4 (11) Продуциране на млечна киселина от МКБ, изолирани от *H. perforatum* L. Данните представляват средна стойност ±SD



Фиг. 5 (12) Продуциране на млечна киселина от МКБ, изолирани от *Panax ginseng* C.A.Meyer. Данните представляват средна стойност ±SD

От 154 единични бактериални изолати, показващи фенотипна идентичност с групата на МКБ, изолирани от различните медицински растения и/или находища, са подбрани 54 изолата, синтезиращи най-високи концентрации млечна киселина.: SofIB271, SofIB277, SofIB279, SolIB284, SolIB285, SolIB288, SosIB301, SosIB312, SosIB328 (от *S. officinalis* L.); SrlSH132, SrlSH141, SrlSH144, SrsV151, SrsV161, SrfV181, SrfV183, SrfIB232, SrfIB233 (от *S. ringens* Sibth. & Sm.); SbfGER352, SbfGER373, SbfGER401 (от *S. blepharophylla* Brandegee ex Epling); SsfIB21, SsfIB22, SsfIB24, SsfIB32, SsfIB33, SsfIB34, SsfRU61, SsfRU62 (от *S. scabiosifolia* Lam.); GsfIS60, GsfIS65, GsfIS69, GsfIS76, GsfIV123, GsfIV124, GslIV123, GslIV124, GslIV213, GsfIV313, GslIV312, GsfIB2101, GsfIB2115, GslIB2212, GslIB2227 (от *G. sanguineum* L.); HpfPER15, HpfPER27, HpfPER39 (от *H. perforatum* L.); PglGER1, PglGER3, PglGER26, PglGER32, PglGER39, PglGER51, PglGER63 (от *P. ginseng* C.A.Meyer).

2.2.3. Определяне на степента на халотолерантност и температурните и pH диапазони на развитие на бактериалните изолати

Други елементи от фенотипната характеристика на единичните бактериални изолати, принадлежащи към групата на МКБ, са способността им за развитие в широк температурен и pH диапазон, както и степента им на халотолерантност (Таблица 2 (10)). Почти всички изолати - коки от *G. sanguineum* и четирите вида *Salvia*, както и пръчки от *P. ginseng* - показват много добър растеж в широк температурен интервал (15 ºC – 45 ºC) и добър такъв при 4 ºC. Растежът на коките от *G. sanguineum* е слаб при 55ºC, а при тези, изолирани от *Salvia*, няма развитие при тази температура. Отчетен е по-тесен интервал (30 ºC – 45 ºC) за много добър растеж и липса на растеж (при 55 ºC) за коките, изолирани от *H. perforatum*. pH интервалът за развитие на повечето изолати, от всички изследвани растения, също е в широк диапазон, т.е. в диапазона 5.0-9.6 е отчетен добър и много добър растеж, както и липса на такъв при стойност на pH 3.0. Изключения се наблюдават при изолатите с пръчковидна форма, от *P. ginseng*, при някои от които е отчетен слаб растеж при pH 3.0. Данни за широк температурен интервал за развитие (10 ºC – 45 ºC) и (15 ºC – 45 ºC) са съобщени и от Baradaran et al. (2012) и Tanasupawat et al. (2007), съответно за лактококи и лактобацили, изолирани от билката *Polygonum minus* и за лактококи от ферментирали чаени листа. Tanasupawat et al. (2007) съобщават за липса на растеж на лактобацилите при 45 ºC. Същите автори са установили, че изследваните от тях изолати се развиват добре и в широк pH-интервал – 3.0-7.0 и 4.0-8.5, което е в съгласие и с докладваните резултати от Tamang et al. (2005), за лактококи с друг растителен произход. Alemayehu et al. (2014) доказват добро развитие при pH 9.5 на лактококи, изолирани от няколко вида трева и зеленчуци. По изследваните два показателя, тестваните от нас изолати от растителен произход показват по-добри или сходни растежни характеристики, в сравнение с тези на МКБ от млечен произход (Таблица 2 (10)). Растителните изолати показват също и съществено по-висока степен на холотолерантност, отколкото млечните (Таблица 2 (10)).

Преобладаващата част от растителните изолати се развиват добре и много добре в среда, съдържаща NaCl в концентрации от 3.0% до 6.5%. При 8.5%-на и 10%-на концентрация на NaCl, около 1/2 от изолатите от *G. sanguineum*, *H. perforatum* и *Salvia* показват развитие, но в по-ниска степен, докато преобладаващата част от изолатите от *P. ginseng* проявяват добър растеж при горепосочените концентрации NaCl. Отчетена е липса на растеж при всички изследвани концентрации на NaCl на изолатите, получени от *S. blepharophylla* (SbfGER352, SbfGER373, SbfGER401). Tamang et al. (2005) и Baradaran et al. (2012) установяват нисока степен на халотолерантност (развитие в присъствие на 10% NaCl и 6.5% NaCl), а Kimoto et al. (2004) и Tanasupawat et al. (2007) по-ниска степен (развитие в присъствие на 4.0% NaCl) за лактококи от различен растителен произход. Baradaran et al. (2012) установяват добро развитие на лактобацили, изолирани от *Polygonum minus,* а Alemayehu et al. (2014) на лактококи от трева и зеленчуци, в присъствие на 6.5% NaCl.

Таблица 2 (10). Влияние на температурата, pH и концентрацията на NaCl върху преживяемостта на изследваните бактериални изолати и МКБ с млечен произход

Изолати	Температура (°C)						pH					NaCl (%)				
	4	15	30	37	45	55	3.0	5.0	7.0	8.0	9.6	3.0	4.5	6.5	8.5	10.0
SsfIB21	+	++	++	++	++	-	-	+	++	++	++	++	++	++	+	-
SsfIB22	+	++	++	++	++	-	-	+	++	++	++	++	++	++	+	+^{w}
SsfIB24	+	++	++	++	++	-	-	+	++	++	++	++	++	++	+	-
SsfIB32	+	++	++	++	++	-	-	+	++	++	++	++	++	++	+	-
SsfIB33	+	++	++	++	++	-	-	+	++	++	++	++	++	++	+^{w}	+^{w}
SsfIB34	+	++	++	++	++	-	-	+	++	++	+	++	++	++	+	-
SsfRU61	+	++	++	++	-	-	-	+	++	++	+	++	+	-	-	-
SsfRU62	+	++	++	++	-	-	-	+	++	+	+	++	+	-	-	-
SrlSH132	+^{w}	+	++	++	++	-	-	+	++	++	++	+	+	+	+ -	-
SrlSH141	+	++	++	++	++	-	-	+	++	++	++	++	++	+	-	-
SrlSH144	+	++	++	++	++	-	-	+	++	++	++	+	+	+^{w}	+^{w}	-
SrsV151	+	++	++	++	++	-	-	++	++	++	++	++	++	++	+	+
SrsV161	+	++	++	++	++	-	-	+	++	++	++	++	++	++	+	+
SrfV181	+^{w}	+	++	++	+^{w}	-	-	+	++	++	+	+	+	-	-	-
SrfV183	+	++	++	++	+^{w}	-	-	+	++	++	++	++	++	+	-	-
SrfIB232	+	+	++	++	+^{w}	-	-	+	++	++	+	++	++	+	-	-
SrfIB233	+^{w}	+	++	++	+^{w}	-	-	+	++	+	+	++	+	+	+	-
SofIB271	+	++	++	++	++	-	-	+	++	++	++	++	++	++	+	-
SofIB277	+	++	++	++	++	-	-	+	++	++	++	++	++	++	+	-
SofIB279	+	++	++	++	++	-	-	+	++	++	++	++	++	++	++	+^{w}
SolIB284	+	++	++	++	++	-	-	+	++	++	+	++	++	++	+	-
SolIB285	+	++	++	++	++	-	-	+	++	++	++	++	++	++	+	-
SolIB288	+	++	++	++	++	-	-	+	++	++	+	++	++	++	+	-
SosIB301	+	++	++	++	++	-	-	+	++	++	+	++	++	++	+	+^{w}
SosIB312	+	++	++	++	++	-	-	+	++	++	++	++	++	++	+	+^{w}
SosIB328	+	++	++	++	++	-	-	+	++	++	++	++	++	++	++	-
SbfGER352	+^{w}	+^{w}	++	++	++	-	-	+	++	++	+	-	-	-	-	-
SbfGER373	+^{w}	+^{w}	++	++	++	-	-	+	++	++	+	-	-	-	-	-
SbfGER401	+^{w}	+^{w}	++	++	++	-	-	+	++	+	+	-	-	-	-	-
GsfIS60	+	+	++	++	++	+^{w}	-	+	++	++	+	+^{w}	+^{w}	+^{w}	-	-
GsfIS65	+^{w}	+	++	++	++	+	-	+	++	++	+	+^{w}	+^{w}	-	-	-
GsfIS69	+^{w}	+	++	++	++	+	-	+	++	++	+	+^{w}	+^{w}	-	-	-
GsfIS76	+	+	++	++	++	+^{w}	-	+^{w}	++	++	+^{w}	+^{w}	+^{w}	+^{w}	-	-
GsfIV123	+	++	++	++	++	+^{w}	-	+	++	++	++	++	+	+	+^{w}	+^{w}
GsfIV124	+	++	++	++	++	+	-	+	++	++	+	++	++	++	+	+^{w}
GslIV123	+	++	++	++	++	+^{w}	-	+	++	++	+	++	++	++	+	+^{w}
GslIV124	+	++	++	++	++	+	-	+	++	++	+	++	++	+	+	+^{w}
GslIV213	+	++	++	++	++	-	-	+^{w}	++	++	++	+	+	+^{w}	-	-
GsfIV313	+	++	++	++	++	+^{w}	-	+	++	++	++	++	+	+	+^{w}	+^{w}

GslIV312	+	++	++	++	++	$+^{w}$	-	+	++	++	++	++	+	+	$+^{w}$	$+^{w}$
GsfIB2101	+	++	++	++	++	$+^{w}$	-	+	++	++	++	++	++	++	+	$+^{w}$
GsfIB2115	+	++	++	++	++	$+^{w}$	-	+	++	++	+	++	++	++	+	$+^{w}$
GslIB2212	+	++	++	++	++	$+^{w}$	-	+	++	++	++	++	++	++	+	$+^{w}$
GslIB2227	+	++	++	++	++	$+^{w}$	-	+	++	++	+	++	++	+	$+^{w}$	$+^{w}$
HpfPER15	+	+	++	++	+	-	-	+	++	++	+	++	++	+	+	$+^{w}$
HpfPER27	+	+	++	++	+	-	-	+	++	++	+	++	++	+	+	$+^{w}$
HpfPER39	+	+	++	++	+	-	-	+	++	++	+	++	++	+	+	$+^{w}$
PglGER1	+	++	++	++	+	$+^{w}$	+	++	++	++	++	++	++	++	+	+
PglGER3	+	++	++	++	+	$+^{w}$	+	++	++	++	++	++	++	+	+	+
PglGER26	+	++	++	++	+	$+^{w}$	+	++	++	++	+	++	++	+	+	+
PglGER32	$+^{w}$	$+^{w}$	++	++	+	-	-	++	++	++	++	++	++	+	+	-
PglGER39	+	++	++	++	+	-	-	++	++	+	+	++	++	+	+	+
PglGER51	$+^{w}$	++	++	++	+	-	-	+	+	+	+	++	++	+	+	-
PglGER63	$+^{w}$	+	++	++	+	-	-	++	++	++	++	++	++	+	+	-
***Lb. bulgaricus* LB1-9**	$+^{w}$	+	++	++	+	-	-	++	++	++	$+^{w}$	+	+	$+^{w}$	$+^{w}$	-
***Lb. rhamnosus* LR2**	$+^{w}$	+	++	++	+	-	-	++	++	++	+	++	+	$+^{w}$	$+^{w}$	-
***Lc. lactis* LL3**	$+^{w}$	$+^{w}$	++	++	-	-	-	+	++	+	$+^{w}$	++	+	$+^{w}$	-	-
***Lc. cremoris* LC1**	-	$+^{w}$	++	++	-	-	-	+	++	+	-	+	-	-	-	-
***Lc. diacetylactis* LD5**	$+^{w}$	+	++	++	-	-	-	+	++	+	$+^{w}$	+	+	$+^{w}$	-	-
***S. thermophilus* ST3**	$+^{w}$	$+^{w}$	++	++	++	$+^{w}$	-	+	++	+	$+^{w}$	$+^{w}$	$+^{w}$	$+^{w}$	-	-
***E. faecium* EF4**	+	++	++	++	++	$+^{w}$	-	+	++	++	++	++	++	+	+	$+^{w}$

Растеж: ++ много добър; + добър; - няма растеж; $+^{w}$ слаб;

В заключение, единичните бактериални изолати, показващи фенотипна идентичност с групата на МКБ, показват способност за развитие в по-широк температурен и pH диапазон, както и по-висока степен на халотолерантност, в сравнение с МКБ от млечен произход (Таблица 2 (10)). При изолатите с коковидна форма pH интервалът на развитие е 5.0-9.6, докато температурният интервал е еднакъв за бактериалните изолати от *Salvia* и *H. perforatum* (4-45°C) и по-висок за тези от *G. sanguineum* (4-55°C). Степента на халотолерантност на бактериалните изолати от *H. perforatum* е най-висока до 10.0% NaCl, докато за тези от *Salvia* и *G. sanguineum* степента на халотолерантност е в различни диапазони (3.0-4.5; 3.0-6.5; 3.0-8.5; 3.0-10.0% NaCl). При трите изолата PglGER1 PglGER3 PglGER26, изолирани от *P. ginseng* (с пръчковидна форма), температурните и pH интервали на развитие са в по-широк диапазон (4-55°C и pH 3.0-9.6), а при останалите изолати диапазоните са 4-45°C и pH 5.0-9.6. Степента на халотолерантност на изолатите е също висока (3.0-8.5; 3.0-10.0% NaCl) и сравнима с тази на изолатите от *H. perforatum* и *G. sanguineum* (Таблица 2 (10)).

2.2.4. Биохимична характеристика на МКБ от растителен произход

Новоизолираните единични бактериални изолати, показващи фенотипна идентичност с групата на МКБ, са подложени на първоначална идентификация. Тя е извършена на база въглехидратен метаболизъм и ензимни реакции, чрез API 50 CHL

(за лактобацили) и API 20 STREP (за лактококи) тестове (BioMerieux, Франция). Резултатите са обработени чрез софтуер API web version 1.1.0.

На база способността им да ферментират 49 различни въглехидрата (API 50 CHL), изолатите с пръчковидна форма (PglGER1, PglGER3, PglGER26, PglGER32, PglGER39, PglGER51 и PglGER63, изолирани от *P. ginseng*) са отнесени към вида *Lactobacillus rhamnosus* с висока степен на достоверност – над 99% (Таблица 3 (11)).

Таблица 3 (11). Биохимична характеристика и начална идентификация на МКБ с пръчковидна форма, чрез API 50 CHL система (Biomeriuex, Франция)

Изолат	Видова принадлежност	Достоверност, %
PglGER1	*Lactobacillus rhamnosus*	99.8
PglGER3	*Lactobacillus rhamnosus*	99.8
PglGER26	*Lactobacillus rhamnosus*	99.9
PglGER32	*Lactobacillus rhamnosus*	99.2
PglGER39	*Lactobacillus rhamnosus*	99.9
PglGER51	*Lactobacillus rhamnosus*	99.8
PglGER63	*Lactobacillus rhamnosus*	99.8

Въз основа на въглехидратния метаболизъм и на някои специфични ензимни реакции, изолатите с кокивидна форма са идентифицирани като различни видове от родовете *Lactococcus, Streptococcus* и *Enterococcus* (Таблица 4 (12)).

Таблица 4 (12). Биохимична характеристика и начална идентификация на МКБ с коковидна форма, чрез API 20 STREP система (Biomeriuex, Франция)

Изолат	Видова принадлежност	Достоверност, %
SsfIB21	*E. faecium*	73.0
SsfIB22	*E. faecium*	71.9
SsfIB24	*E. faecium (E. casseliflavus)*	71.9
SsfIB32	*E. faecium*	73.0
SsfIB33	*E. faecium*	71.2
SsfIB34	*E. faecium*	73.0
SsfRU61	*Lc. lactis subsp cremoris*	90.8
SsfRU62	*Lc. lactis subsp cremoris*	90.8
SrlSH132	*E. faecium (E. casseliflavus)*	86.5
SrlSH141	*E. faecium (E. casseliflavus)*	79.6
SrlSH144	*E. faecium (E. casseliflavus)*	84.8
SrsV151	*E. avium (E. casseliflavus)*	96.3
SrsV161	*E. faecium*	73.0
SrfV181	*Lc. lactis subsp lactis*	64.9
SrfV183	*Lc. lactis subsp lactis*	53.6
SrfIB232	*Lc. lactis subsp cremoris*	80.5
SrfIB233	*Lc. lactis subsp cremoris*	80.5
SofIB271	*E. faecium*	71.9
SofIB277	*E. faecium*	71.9
SofIB279	*E. faecium*	73.0
SolIB284	*E. faecium*	73.0
SolIB285	*E. faecium (E. casseliflavus)*	71.9
SolIB288	*E. faecium (E. casseliflavus)*	71.9

SosIB301	*E. faecium*	84.8
SosIB312	*E. faecium*	73.0
SosIB328	*E. faecium*	71.9
SbfGER352	*Lc. lactis subsp cremoris (S. thermophilus)*	70.0
SbfGER373	*Lc. lactis subsp cremoris (S. thermophilus)*	77.9
SbfGER401	*Lc. lactis subsp cremoris (S .thermophilus)*	65.5
GsfIS60	*Lc. lactis subsp cremoris (S. thermophilus)*	90.8
GsfIS65	*Lc. lactis subsp cremoris (S. thermophilus)*	60.5
GsfIS69	*Lc. lactis subsp cremoris (S. thermophilus)*	57.9
GsfIS76	*Lc. lactis subsp cremoris (S. thermophilus)*	99.2
GsfIV123	*E. faecium*	84.2
GsfIV124	*E. faecium*	82.5
GslIV123	*E. faecium*	84.8
GslIV124	*E. faecium*	73.0
GslIV213	*E. faecium*	82.5
GsfIV313	*E. faecium*	86.4
GslIV312	*E. faecium*	84.8
GsfIB2101	*E. faecium*	85.4
GsfIB2115	*E. faecium*	76.4
GslIB2212	*E. faecium*	85.4
GslIB2227	*E. faecium*	84.8
HpfPER15	*E. faecium*	84.8
HpfPER27	*E. faecium*	84.2
HpfPER39	*E. faecium*	73.0

В заключение, от различните видове *Salvia* са идентифицирани представители на родовете *Enterococcus*, *Lactococcus* и *Streptococcus*, като от *S. blepharophylla* - само род *Streptococcus* (3 броя), от *S. officinalis* – само род *Enterococcus* (9 броя), а от *S. ringens* и *S. scabiosifolia* – представители на род *Enterococcus* (съответно 5 и 6 броя) и *Lactococcus* (съответно 4 и 2 броя). Изолатите от *G. sanguineum* L. са отнесени към родовете *Streptococcus* (4 броя) и *Enterococcus* (11 броя), докато от *H. perforatum* – само към *Enterococcus* (3 броя).

На база морфологични, физиологични и биохимични характеристики са идентифицирани представители на родовете *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* и *Enterococcus*, изолирани от *Geranium sanguineum* L., *Hypericum perforatum* L., *Panax ginseng* C.A.Meyer, *Salvia officinalis* L., *Salvia ringens* Sibth. & Sm., *Salvia blepharophylla* Brandegee ex Epling и *Salvia scabiosifolia* Lam.

3. Генетична идентификация на млечнокисели бактерии от растителен произход

Генетичните методи дават точна и прецизна идентификация на микроорганизмите. В основата си генетично-базираните методи като 16S рДНК представляват едно успешно допълнение към фенотипните методи за прецизно идентифициране на МКБ, изолирани от определени микробни съобщества (Kostinek et al., 2007; Tanasupawat et al., 2007; Chen et al., 2010; Kpikpi et al., 2010; Baradaran et al., 2012; Venturi et al., 2012; Alemayehu et al., 2014). Независимо от широкото разпространение на МКБ, всеки растителен хабитат се характеризира със специфична микробоценоза, притежаваща различна биологична активност.

Всички изолати от *H. perforatum*, както и преобладаващата част от анализираните изолати от *G. sanguineum* L. (73.3%) и от 4-те вида *Salvia* (69.0%), показват принадлежност към род *Enterococcus*. Щам HpfPER39, изолиран от *H. perforatum*,

показа 99% подобие към вид – *E. faecium*, докато останалите два изолата (HpfPER15 и HpfPER27) показват 97% степен на подобие с този вид. Щамовете GsfIB2115, GslIB2227, GsfIV123, GslIV123, GslIV213 са отнесени към вида *E. faecium*, на база пълното съответствие на фенотипната характеристика и резултата от PCR анализа с достигната 100% хомоложност на нуклеотидна последователност. Към същия вид са отнесени и щамовете GsfIB2101, GslIB2212, GsfIV124, GsfIV313, GslIV124, GslIV312 показали също висока степен на хомоложност – 99 %. От изолираните щамовете МКБ от 4-те вида *Salvia*, SofIB271, SofIB279, SofIB284, SofIB328 показват 100% сходство с *E. faecium*. Щамовете SsfIB21, SsfIB22, SsfIB32, SsfIB33, SsfIB34, SofIB277, SosIB301, SosIB312, SrsV161 показват също висока степен на сходство с този вид – 99%.

Щамовете SrlSH132, SrlSH141, SrlSH144 показват еднаква хомоложност (99%) към два вида – *E. casseliflavus* и *E. gallinarum*, но фенотипното различие между двата изолата относно цвета на колонията, съответно жълт и бял, определи принадлежността на изолатите към *E. casseliflavus*. Като *E. mundtii* са идентифицирани щамовете SsfIB24, SrsV151, SolIB288 показали 99% и SolIB285 – 100% хомоложност на нуклеотидна последователност.

26.7% от анализираните изолати от *G. sanguineum* и 10.7% от изолатите от 4-те вида *Salvia*, са идентифицирани като представители на род *Streptococcus*. Висока степен на сходство (99.0%) с *S. thermophilus*, е регистрирана за щамовете GsfIS60, GsfIS65, GsfIS76, GsfIS69 (изолирани от *G. sanguineum*), както и за щамовете SbfGER352, SbfGER373, SbfGER401 (изолирани от *S. blepharophylla*).

20.7% от изолатите, получени от видовете *Salvia*, са идентифицирани като представители, съответно на род *Lactococcus*. Висока степен на сходство (99%) с *Lc. lactis* subsp *lactis* е регистрирана за щамовете SsfRU61, SsfRU62, SrfV183, SrfIB232, SrfIB233, а при щам SrfV181 - достигнатото сходство е 100%.

Анализираните изолати, от *P. ginseng*, са идентифицирани като *Lactobacillus rhamnosus*. Щамовете PglGER39, PglGER26, PglGER32, PglGER63, PglGER3 показват хомоложност 99%, а при щамове PglGER1 и PglGER51 - достигнатото сходство е 100%.

Получените нуклеотидни последователности са депозирани в NCBI GenBank. В таблица 5 (13) са представени съответните щамове с номерата за достъп в генбанката.

Данни за наличие на генотипно идентифицирани представители на откритите от нас видове от род *Enterococcus, Lactococcus, Streptococcus, Lactobacillus* в други, различни по произход растителни изолати са съобщени и от други автори (Hartnett et al., 2002; Kimoto et al., 2004; Nomura et al., 2006; Cock and De Stouvenel, 2006; Baradaran et al., 2012; Michaylova et al., 2007; Magnusson et al., 2003, Chen et al., 2010). Hartnett et al. (2002) докладват за идентифициран *E. faecium* и *Lc. lactis* в изолати от суров ечемик, а в изолати от тропическо жито е определен видът *E. mundtii* и видът *E. faecalis* - неоткрит в изследваните от нас раститения. Видът *Lc. lactis* е изолиран и идентифициран от тип японска трева (napiergrass) (Kimoto et al., 2004; Nomura et al., 2006) и от листа от захарна цвекло (Cock and De Stouvenel, 2006). Освен *Lc. lactis*, Baradaran et al. (2012) са определили *Pediococcus pentosaceus* и *Lactobacillus curvatus* в изолати от *Polygonum minus* (малайзийска билка), а Chen et al. (2010) са изолирали и *Lb. plantarum, Weissella cibaria* и *Leuconostoc pseudomesenteroides* от зрели черници в Тайван. *S. thermophilus* е изолиран от листа на 14 растителни вида, а от 4 от растителните изолати е изолиран и идентифициран и *Lactobacillus bulgaricus* (Michaylova et al., 2007). Magnusson et al. (2003) са изолирали представители на род *Lactobacillus* (*Lb. plantarum, Lb. coryniformis, Lb. acidophilus, Lb. sakei*) и род

Pediococcus и *E. hirae*, от различни части на растения (Grass, Dandelion, Lilac, Chestnut, Hapatica, Coltsfoot and Rowan), които не са открити в изследваните от нас растения.

Обобщавайки посочените данни следва да се отбележи, че всеки изследван растителен хабитат представлява една отделна екологична ниша за развитие на специфична млечнокисела микрофлора.

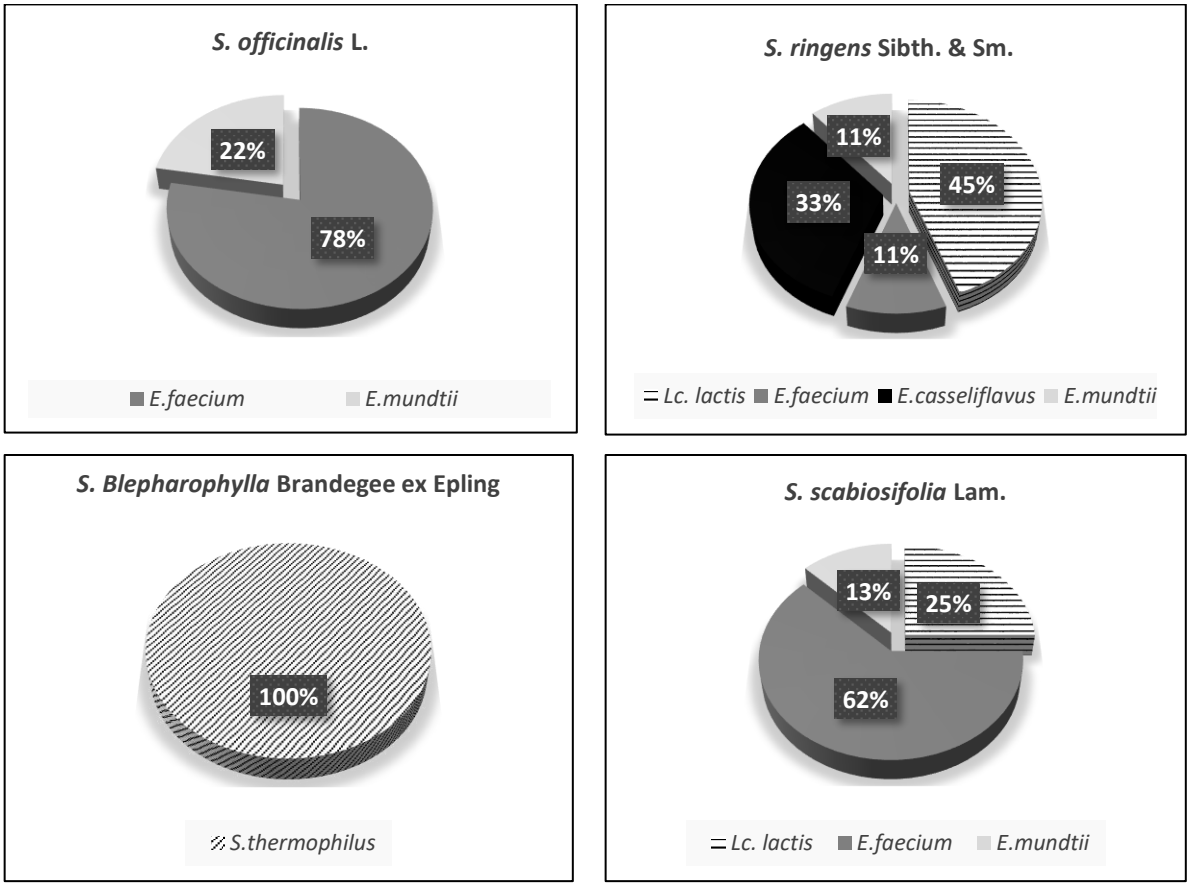
Таблица 5 (13). Номера за достъп на изолираните МКБ от растенията *G. sanguineum* L., *H. perforatum* L., *P. ginseng* C.A.Meyer, *S. officinalis* L., *S. ringens* Sibth. & Sm., *S. blepharophylla* Brandegee ex Epling и *S. scabiosifolia* Lam. в NCBI GenBank

Микроорганизъм	Щам	Номер за достъп	Микроорганизъм	Щам	Номер за достъп
E. faecium	GsfIB2115	KR054662	*S. thermophilus*	SbfGER401	KR265135
E. faecium	GsfIB2101	KR054663	*E. faecium*	SofIB271	KR265136
S. thermophilus	GsfIS60	KR054664	*E. faecium*	SofIB277	KR265137
S. thermophilus	GsfIS65	KR054665	*E. faecium*	SofIB279	KR265138
S. thermophilus	GsfIS69	KR054666	*E. faecium*	SolIB284	KR265139
S. thermophilus	GsfIS76	KR054667	*E. mundtii*	SolIB285	KR265140
E. faecium	GsfIV123	KR054668	*E. mundtii*	SolIB288	KR265141
E. faecium	GsfIV124	KR054669	*E. faecium*	SosIB301	KR265142
E. faecium	GsfIV313	KR054670	*E. faecium*	SosIB312	KR265143
E. faecium	GslIB2212	KR054671	*E. faecium*	SosIB328	KR265144
E. faecium	GslIB2227	KR054672	*Lactococcus lactis*	SrfIB232	KR265145
E. faecium	GslIV123	KR054673	*Lactococcus lactis*	SrfIB233	KR265146
E.faecium	GslIV124	KR054674	*Lactococcus lactis*	SrfV181	KR265147
E.faecium	GslIV213	KR054675	*Lactococcus lactis*	SrfV183	KR265148
E. faecium	GslIV312	KR054676	*E. casseliflavus*	SrlSH132	KR265149
E. faecium	HpfPER15	KR054677	*E. casseliflavus*	SrlSH141	KR265150
E. faecium	HpfPER27	KR054678	*E. casseliflavus*	SrlSH144	KR265151
E. faecium	HpfPER39	KR054679	*E. mundtii*	SrsV151	KR265152
Lb. rhamnosus	PglGER1	KR054680	*E. faecium*	SrsV161	KR265153
Lb. rhamnosus	PglGER3	KR054681	*E. faecium*	SsfIB21	KR265154
Lb. rhamnosus	PglGER26	KR054682	*E. faecium*	SsfIB22	KR265155
Lb. rhamnosus	PglGER32	KR054683	*E. mundtii*	SsfIB24	KR265156
Lb. rhamnosus	PglGER39	KR054684	*E. faecium*	SsfIB32	KR265157
Lb. rhamnosus	PglGER51	KR054685	*E. faecium*	SsfIB33	KR265158
Lb. rhamnosus	PglGER63	KR054686	*E. faecium*	SsfIB34	KR265159
S. thermophilus	SbfGER352	KR265133	*Lactococcus lactis*	SsfRU61	KR265160
S. thermophilus	SbfGER373	KR265134	*Lactococcus lactis*	SsfRU62	KR265161

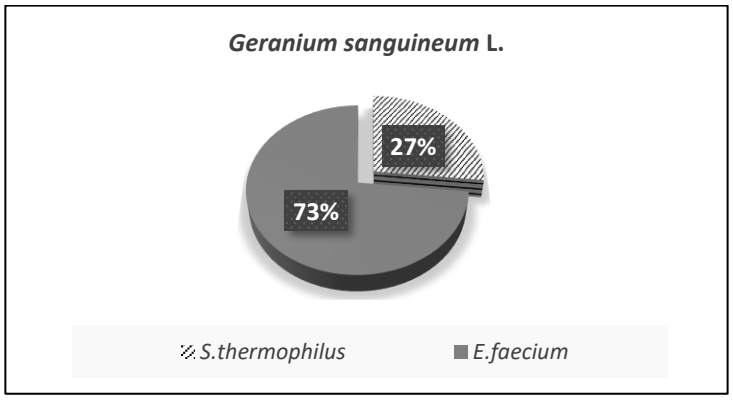
На база данните от извършения 16S рДНК генен секвенционен анализ, чрез програма MEGA version 4 е конструирано филогенетично дърво, определящо филогенетичната позиция на изолираните секвенции от изследваните щамове с растителен произход (фиг. 6 (14)).

Фиг. 6 (14) Филогенно дърво базирано на 16S рДНК последователности на идентифицираните щамове, изолирани от медицинските растения *G. sanguineum* L., *H. perforatum* L., *P. ginseng* C.A.Meyer, *S. officinalis* L., *S. ringens* Sibth. & Sm., *S. blepharophylla* Brandegee ex Epling и *S. scabiosifolia* Lam., с използване на neighbor-joining метод

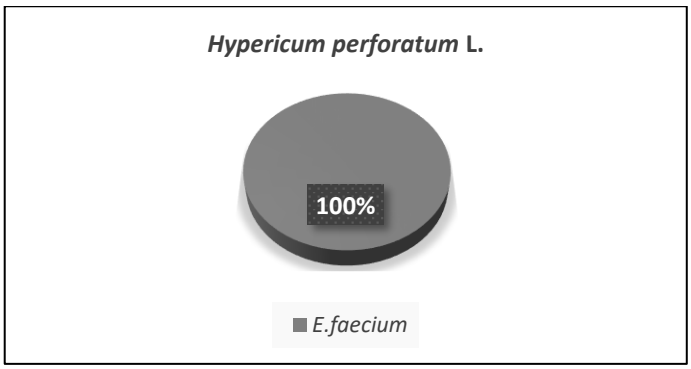
В заключение, за пръв път е изследвано биоразнообразието на млечнокисели бактерии в медицинските растения *S. officinalis* L., *S. ringens* Sibth. & Sm., *S. blepharophylla* Brandegee ex Epling, *S. scabiosifolia* Lam., *S. tomentosa* Mill, *G. sanguineum* L., *H. perforatum* L. и *P. ginseng* C.A. Meyer (фиг. 7 (15), 8 (16), 9 (17), 10 (18)). Резултатите доказват, че изследваните растения са подходяща екологична ниша за изолиране на МКБ, с изключение на *S. tomentosa* Mill.



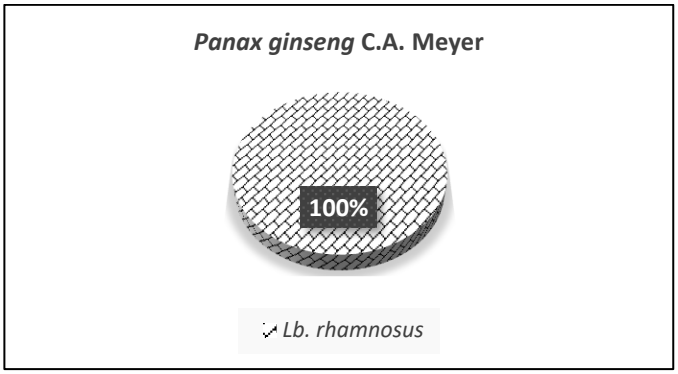
Фиг. 7 (15) Биоразнообразие на МКБ, изолирани от видове *Salvia*



Фиг. 8 (16) Биоразнообразие на МКБ, изолирани от *G. sanguineum* L.



Фиг. 9 (17) Биоразнообразие на МКБ, изолирани от *H. perforatum* L.



Фиг. 10 (18) Биоразнообразие на МКБ, изолирани от *P. ginseng* C.A. Meyer

По-голямо е разнообразието на коковидните МКБ (87%), в сравнение с тези с пръчковидна форма (13%). От изследваните растения са изолирани и идентифицирани 54 МКБ, принадлежащи към родовете *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* и *Lactobacillus*. Представителите на род *Lactobacillus* са изолирани само от *P. ginseng* C.A. Meyer, докато растенията *S. officinalis* L., *S. ringens* Sibth. & Sm., *S. blepharophylla* Brandegee ex Epling, *S. scabiosifolia* Lam., *G. sanguineum* L. и *H. perforatum* L. са източници за изолиране МКБ от родовете *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*.

4. Характеристика на екстракти от *Salvia officinalis* L., *Geranium sanguineum* L., *Hypericum perforatum* L. и *Panax ginseng* C.A.Meyer

Лечебните растения са известни с широкоспектърните си свойства. Техните биоактивни компоненти проявяват антимикробно, антиоксидантно, антиалергично, антитуморно, имуномодулиращо, противовъзпалително, обезболяващо, противостареещо, антидепресивно, регенериращо и редица други действия, благоприятсващи здравето на хората. Обект на нашите изследвания са водно-алкохолни екстракти (70% (v/v) етанол) от медицинските растения *Salvia officinalis* L. (градински чай), *Hypericum perforatum* L. (жълт кантарион), *Panax ginseng* C.A.Meyer (жен-шен) и *Geranium sanguineum* L. (кръвен здравец), които са с доказани лечебни свойства. Тези видове екстракти представляват интерес за нас, поради възможността те да бъдат прилагани в хранителни продукти, като носители на различни биологични активности.

4.1. Анализ на полифенолния профил на получените екстракти чрез HPLC анализ

Изследвани са фенолни киселини и флавоноиди, като основни носители на висока биологична активност, във водно-алкохолните екстракти на тестваните медицински растения. Изследваните растения продуцират разнообразни биологично активни вещества: в представителите на род *Salvia* основно се съдържат етерични масла, тритерпени и фенолни съединения (фенолни киселини, флавоноиди) (Martins et al., 2015; Sytar et al, 2016); *G. sanguineum* L. синтезира полифенолни съединения (фенолни киселини, флавоноиди, танини, катехини) (Pantev et al., 2006); *Hypericum perforatum* L. съдържа полифенолни съединения (нафтодиантрони, флороглюциноли, фенолни киселини, флавоноиди, бифлавони, фенилпропани, проантоцианидини) и етерични масла (Nahrstedt and Butterweck, 1997; Akhbari and Batooli, 2009; Öztürk et al., 2009); *Panax ginseng* C.A.Meyer съдържа сапонини (гинсенозиди), алкалоиди, полиацетилени, полизахариди, полифеноли, етерични масла, микроелементи, витамини (Jung et al., 2002; Lee et al., 2000; Lee et al., 2012; Park et al., 2003; Chung et al., 2012; Kim, 2016).

Данните за съдържанието на флавониоди и фенолни киселини в екстрактите от *G. sanguineum* L., *S. officinalis* L., *H. perforatum* L. и *P. ginseng* C.A.Meyer показват съществено разнообразие на тези биологично активни компоненти. Те са изразени като µg/g сух екстракт (CE) и са представени в Таблица 6 (14).

Таблица 6 (14). Съдържание на полифенолни съединения (фенолни киселини и флавоноиди) във водно-алкохолни екстракти от *G. sanguineum* L., *S. officinalis* L., *H. perforatum* L. и *P. ginseng* C.A.Meyer

Съединения, µg/g CE		*G. sanguineum* L.	*S. officinalis* L.	*H. perforatum* L.	*P. ginseng* C.A.Meyer
Фенолни киселини					
Производни на бензоената киселина	Галова	2721 ± 74	-	151 ± 22	следи
	3,4-дихидроксибензоена	340 ± 14	-	267 ± 37	-
	2-хидроксибензоена	2059 ± 83	-	922 ± 102	29 ± 3
	Ванилова	-	250 ± 13	397 ± 42	30 ± 4
	Сирингинова	-	703 ± 54	124 ± 14	следи
Производни на канелената киселина	Кафеена	-	-	142 ± 28	-
	Хлорогенова	-	-	258 ± 51	82 ± 6
	р-Кумарова	-	3647 ± 74	48 ± 3	следи
	Синапена	-	-	2195 ± 157	следи
	Ферулова	-	511 ± 45	1376 ± 98	следи
	Канелена	-	-	следи	следи
	Розмаринова	-	48690 ± 233	-	-
Флавоноиди					
Флавонол	Мирцетин	-	126 ± 23	242 ± 31	-
	Каемпферол	-	-	-	-
	Кверцетин	-	-	4206 ± 144	-
Флавононов гликозид	Хесперидин	-	-	950 ± 45	-
Флавон	Апигенин	-	-	-	-
	Лутеолин	-	42 ± 5	764 ± 88	-
Кверцетин гликозиди	Рутин	44 ± 5	9956 ± 124	664 ± 57	-
	Хиперозид	-	17240 ± 133	340 ± 73	-

4.2. Определяне съдържанието на общи фенолни съединения и анализ на антиоксидантна активност, чрез спектрофотометричен анализ

С цел доказване на биологичната активност на поучените водно-алкохолни екстракти (от *Salvia officinalis* L., *Hypericum perforatum* L., *Panax ginseng* C.A.Meyer и *Geranium sanguineum* L.) е изследвана и тяхната антиоксидантна активност, чрез анализиране на способността им да улавят свободните DPPH и ABTS радикали или да редуцират метални йони при FRAP и CUPRAC методите. Резултатите са представени като милимолове Тролокс еквивалент/грам сух екстракт (mMTE/g CE) в Таблица 7 (15). Известно е, че антиоксидантната способност на растителните екстракти се дължи основно на присъствието на фенолни киселини и флавоноиди в тях (Jaberian et al., 2013). Съдържанието на общи фенолни съединения, изразено като mg еквиваленти галова киселина (GAE) за g сух екстракт (mgGAE/g CE) и антиоксидантна активност на изследваните водно-етанолни екстракти са представени в Таблица 7 (15).

Таблица 7 (15). Съдържание на общи фенолни съединения и антиоксидантна активност на екстракти от *G. sanguineum* L., *S. officinalis* L., *H. perforatum* L. и *P. ginseng* C.A.Meyer

Растение	Общи феноли, mgGAE/g CE	DPPH, mMTE/g CE	ABTS, mMTE/g CE	FRAP, mMTE/g CE	CUPRAC, mMTE/g CE
G. sanguineum L.	105.00 ± 1.41	2833.99 ± 6.53	4518.81 ± 16.73	3479.48 ± 44.71	942.15 ± 2.36
S. officinalis L.	97.00 ± 1.41	1100.58 ± 6.53	1191.02 ± 5.02	1040.84 ± 3.89	280.48 ± 2.36
H. perforatum L.	106.00 ± 1.53	2321.27 ± 8.71	2566.62 ± 10.04	1404.08 ± 17.49	490.83 ± 4.72
P. ginseng C.A.Meyer	1.56 ± 0.23	16.00 ± 0.11	29.26 ± 0.59	9.92 ± 2.14	6.11 ± 0.06

В заключение, получените от нас резултати доказват наличието на полифенолни съединения (фенолни киселини и флавоноиди), както и високата антиоксидантна активност на водно-алкохолните екстракти от *S. officinalis* L., *G. sanguineum* L. и *H. perforatum* L., и много ниски концентрации на фенолните съединения и съответно антиоксидантна активност на екстрактите от *P. ginseng* C.A.Meyer.

Изследваните растения са източници на редица биологично активни вещества и различни активности (антиоксидантна, антимикробна, противовъзпалителна, антитуморна, имуномодулираща и др.). Те са широко използвани в медицината и като хранителни добавки, благодарение на тяхните полезни действия, благоприятсващи здравето на хората.

5. Устойчивост на млечнокисели бактерии, изолирани от *Geranium sanguineum* L., *Hypericum perforatum* L., *Panax ginseng* C.A.Meyer и видове от род *Salvia*, към различни растителни екстракти

Независимо от нарастващия интерес към млечнокиселите бактерии, изолирани, както от млечни продукти, така и към тези, изолирани от алтернативни източници, до сега не е изследвана устойчивостта на млечнокиселите бактерии (изолирани от растения), към екстракти от растенията, от които те са изолирани. Интерес за нас представлява, както устойчивостта на МКБ към екстракти от билките, от които те са изолирани, така и към екстракти от другите изследвани растителни видове, с цел последващото култивиране на щамовете в мляко, в присъствие на екстракти.

Изследвана е устойчивостта на щамовете МКБ, изолирани от лечебните растения *S. officinalis* L., *S. blepharophylla* Brandegee ex Epling, *S. ringens* Sibth. & Sm., *S. scabiosifolia* Lam., *G. sanguineum* L., *H. perforatum* L. и *P. ginseng* C.A.Meyer към водно-алкохолни екстракти (70% етанол) от *S. officinalis*, *G. sanguineum*, *H. perforatum* и *P. ginseng*, чрез агар дифузионнен метод. Изследвано е влиянието на растителните екстракти, разтворени, както в 30% етанол, така и във вода, поради по-подходящото й приложение в хранителни продукти. Влиянието на екстрактите от изследваните медицински растения, върху растежа на МКБ, е изследвано в диапазон от 0.01 до 500 mg/ml. Направена е и сравнителна характеристика на изследваните МКБ със същите видове, изолирани от млечни продукти.

Целта на настоящите изследвания е да се направи подбор на резистентни щамове МКБ, подходящи за култивиране в присъствие на растителни екстракти при *in situ* култивиране в мляко.

5.1. Устойчивост на млечнокисели бактерии, изолирани от медицински растения, към растителни екстракти, разтворени в 30% етанол

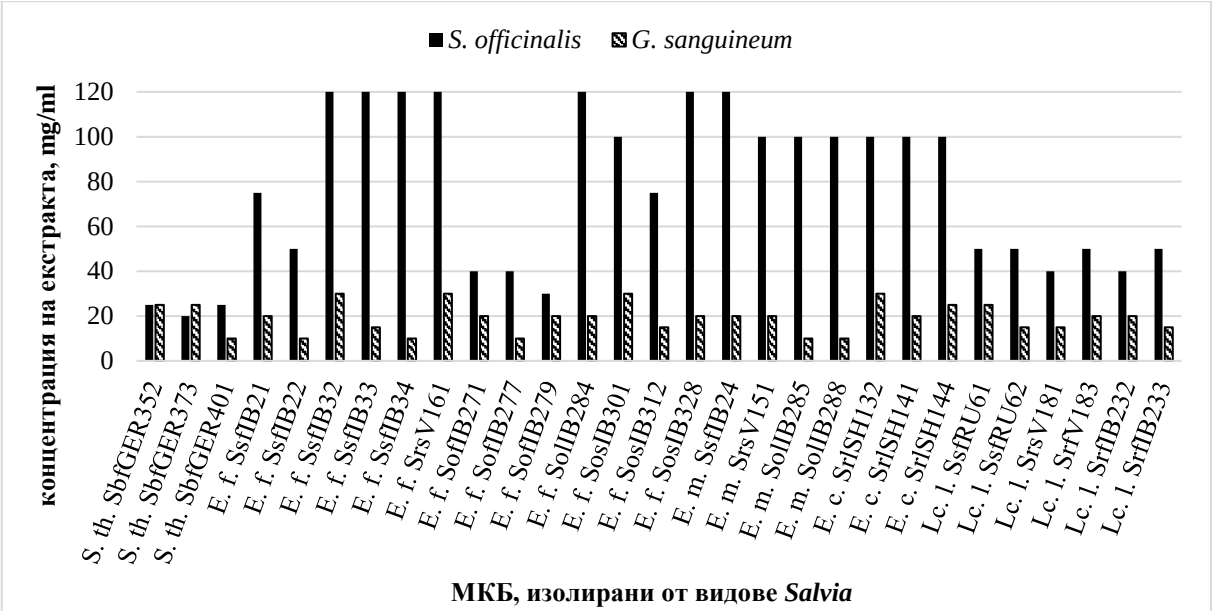
5.1.1. Устойчивост на изолирани щамове млечнокисели бактерии от род *Salvia*

На фиг. 11 (19) е представено влиянието на изследваните растителни екстракти (концентрациите, при които щамовете МКБ са резистентни) върху развитието на 29 щама, принадлежащи към видовете *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus casseliflavus* и *Enterococcus mundtii*, изолирани от *S. officinalis* L., *S. ringens* Sibth. & Sm., *S. blepharophylla* Brandegee ex Epling и *S. scabiosifolia* Lam.

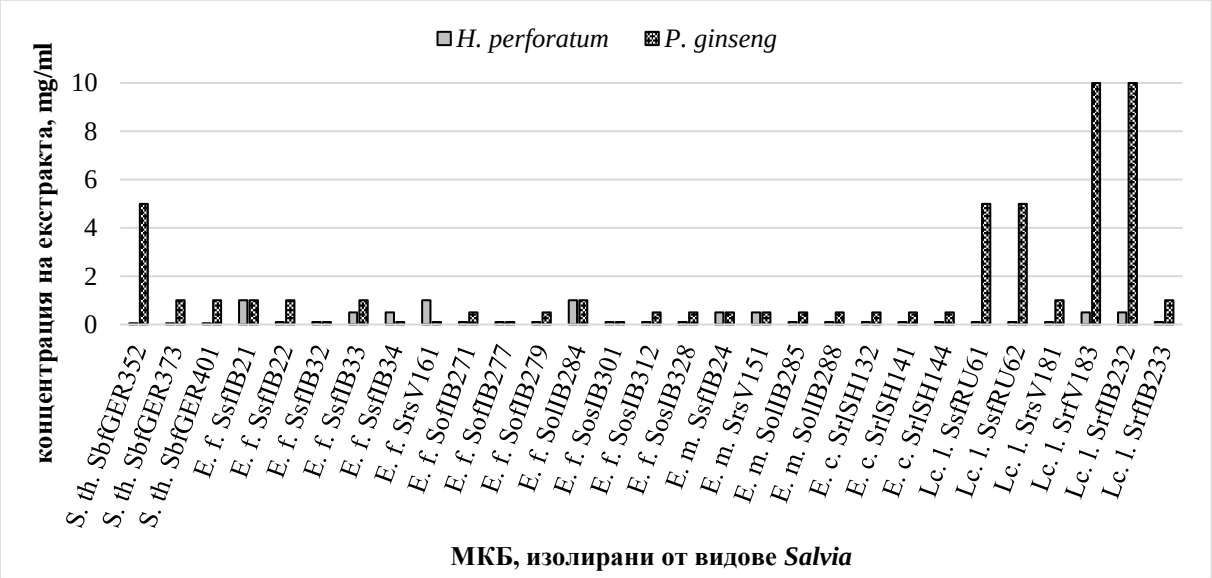
В най-висока степен щамовете *S. thermophilus* са резистентни към водно-алкохолни екстракти от *S. officinalis* (концентрация до 20 mg/ml и 25 mg/ml) и от *G. sanguineum* (концентрация до 10 mg/ml и 25 mg/ml). Щамовете *S. thermophilus* проявяват ниска степен на резистентност към екстракта от *P. ginseng* (концентрация до1 mg/ml и 5 mg/ml) и екстракта от *H. perforatum* (концентрация до 0.05 mg/ml) (фиг. 11 (19)).

Щамовете *Lc. lactis* (SsfRU61, SsfRU62, SrsV181, SrfV183, SrfIB232, SrfIB233) имат сходно поведение спрямо изследваните екстракти: най-висока степен на устойчивост към екстракта от *S. officinalis* (40 mg/ml и 50 mg/ml) и по-слаба към екстракта от *G. sanguineum* (15 mg/ml, 20 mg/ml и 25 mg/ml) (фиг. 11А (19А)); към екстракта от *P. ginseng* щамовете са резистентни до концентрации 1 mg/ml и 10 mg/ml, а към екстракта от *H. perforatum* до 0.1 mg/ml и 0.5 mg/ml (фиг. 11Б (19Б)).

Изследваните представители от род *Enterococcus* принадлежат към 3 вида – *E. faecium*, *E. casseliflavus* и *E. mundtii*. Поведението на щамовете *E. casseliflavus* (SrlSH132, SrlSH141 и SrlSH144) и *E. mundtii* (SsfIB24, SrsV151, SolIB285 и SolIB288) е сходно към екстрактите от *S. officinalis* (100 mg/ml и 120 mg/ml), *G. sanguineum* (10 mg/ml, 20 mg/ml, 25 mg/ml и 30 mg/ml), *P. ginseng* (0.5 mg/ml) и *H. perforatum* (0.1 mg/ml и 0.5 mg/ml), т.е щамовете показват близки стойности на резистентност към всеки от екстрактите (фиг. 11 (19)). Подобно е и поведението на щамовете *E. faecium* към екстрактите от *G. sanguineum* (до 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml и 30 mg/ml) (фиг. 11А (19А)), и *P. ginseng* и *H. perforatum* (0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml и 1 mg/ml) (фиг. 11Б (19Б)). Щамовете *E. faecium* показват разнообразие спрямо екстрактите от *S. officinalis*. 50% от щамове са резистентни до концентрация 120 mg/ml, а останалите - до концентрации, вариращи в диапазона 30-100 mg/ml (фиг. 11А (19А)).



А



Б

Фиг. 11 (19) Устойчивост на млечнокисели бактерии, изолирани от представители на род *Salvia*, към водно-етанолни екстракти от: А – *Salvia officinalis* L. и *G. sanguineum* L.; Б – *Hypericum perforatum* L. и *Panax ginseng* C.A.Meyer, разтворени в 30% етанол
S. th. – *Streptococcus thermophilus*, Lc. l. – *Lactococcus lactis*, E. f. – *Enterococcus faecium*, E. c. – *Enterococcus casseliflavus*, E. m. – *Enterococcus mundtii*
Представени са концентрациите на растителните екстракти, при които растежът на МКБ не се потиска

Щамовете *E. faecium*, *E. casseliflavus* и *E. mundtii* са устойчиви към еднакви концентрации на екстрактите от *P. ginseng* и *H. perforatum* (фиг. 11Б (19Б)). 15.39% от щамовете *E. faecium* (SsfIB34 и SrsV161) показват по-висока резистентност към екстрактите от *H. perforatum*, 46.15% от щамовете (SsfIB21, SsfIB32, SofIB277, SolIB284, SosIB301 и SosIB312) са по-резистентни към екстрактите от *P. ginseng*, а останалите щамове (38.46%) демонстрират еднаква резистентност към двата екстракта. Всички щамове *E. casseliflavus* и 50% от щамовете *E. mundtii* (SolIB285 и SolIB288) са

резистентни към екстрактите от *P. ginseng*, а при другите 50% от щамовете *E. mundtii* (SsfIB24 и SrsV151) влиянието на двата екстракта е еднакво.

Всички изследвани щамове, изолирани от видове *Salvia*, проявяват най-висока резистентност към екстракти от *S. officinalis*, с изключение на *S. thermophilus* SbfGER373, демонстриращ по-висока резистентност към екстракта от *G. sanguineum* (фиг. 11 (19)). Устойчивостта на отделните видове МКБ към изследваните растителни екстракти, може да се обобщи, следвайки последователността:

S. officinalis ≥ ≤ *G. sanguineum* > *P. ginseng* >> *H. perforatum* - за щамовете *S. thermophilus*;

S. officinalis > *G. sanguineum* > *P. ginseng* > *H. perforatum* – за щамовете *Lc. lactis*;

S. officinalis >> *G. sanguineum* >> *P. ginseng* ≥≤ *H. perforatum* – за щамовете *E. faecium*;

S. officinalis >> *G. sanguineum* >> *P. ginseng* ≥ *H. perforatum* - за щамовете *E. mundtii*;

S. officinalis >> *G. sanguineum* >> *P. ginseng* > *H. perforatum* – за щамовете *E. casseliflavus*.

5.1.2. Устойчивост на щамове млечнокисели бактерии, изолирани от *Geranium sanguineum* L.

На фиг. 12 (20) е представено влиянието на водно-етанолните екстракти от изследваните растения (концентрациите, при които щамовете МКБ са резистентни) върху преживяемостта на 4 щама *S. thermophilus* и 11 щама *E. faecium*, изолирани от *G. sanguineum* L.

Щамовете *S. thermophilus* (GsfIS60, GsfIS65, GsfIS69 и GsfIS76), изолирани от *Geranium sanguineum*, проявяват устойчивост до 10 mg/ml и 15 mg/ml към екстракта от растението, от което са изолирани и 3 пъти по-висока устойчивост към екстракта от *S. officinalis* (фиг. 12А (20А)). Те проявяват по-ниска степен на устойчивост към екстракти на *P. ginseng* (до 1 mg/ml и 5 mg/ml) и много ниска към екстракт от *H. perforatum* (до 0.05 mg/ml) (фиг. 12Б (20Б)). Изследваните щамовете *S. thermophilus*, изолирани от видове *Salvia* и от *G. sanguineum*, показват сходен резистентен профил към всичките изследвани екстракти (фиг. 11 (19), 12 (20)).

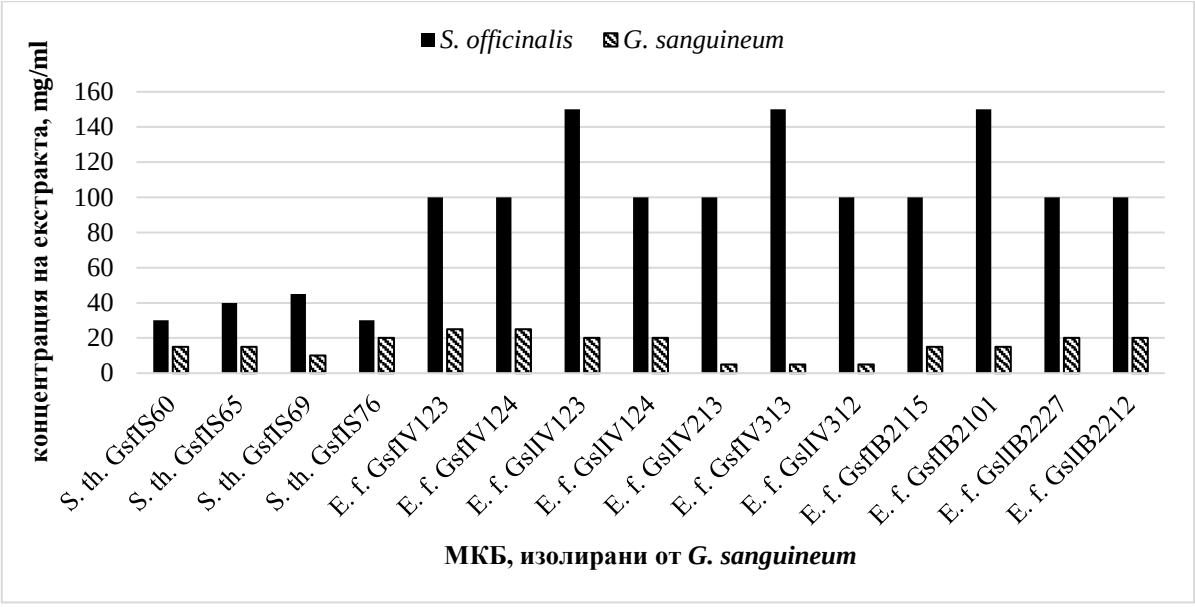
73% от изолираните щамове *E. faecium* (GsfIV123, GsfIV124, GslIV123, GslIV124, GsfIB2115, GsfIB2101, GslIB2227 и GslIB2212) са резистентни към екстракт от *G. sanguineum* до концентрация 15 mg/ml и 25 mg/ml, а щамовете GslIV213, GslIV312 и GsfIV313 до концентрация 5 mg/ml. Спрямо екстрактите от *S. officinalis*, щамовете са резистентни до 100 mg/ml, с изключение на 3 щама (GslIV123, GsfIV313 и GsfIB2101) - до концентрация от 150 mg/ml (фиг. 12А (20А)). Всички изследвани щамове се инхибират от екстракти от *H. perforatum* (над 0.1 mg/ml и 0.5 mg/ml) и *P. ginseng* (0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml и 1 mg/ml) в по-ниски концентрации (фиг. 12Б (20Б)).

Подобно на щамовете *E. faecium*, изолирани от видове *Salvia*, изследваните изолирани щамовете от *G. sanguineum*, показват сходна устойчивост към екстрактите от *H. perforatum* и *P. ginseng*, като 54.55% от тях са резистентни към по-високи концентрации на екстракта от *P. ginseng*, а 45.45% показват еднаква устойчивост и към двата екстракта (фиг. 12Б (20Б)).

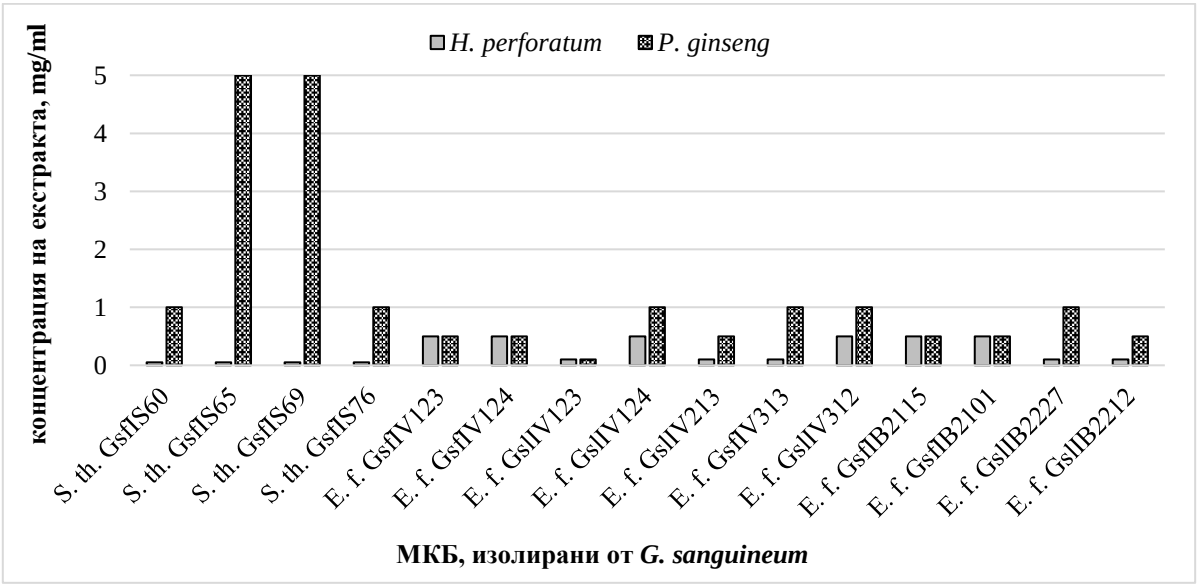
Устойчивостта на щамовете *S. thermophilus* и *E. faecium* към изследваните екстракти може да се обобщи в следната последователност:

S. officinalis > *G. sanguineum* > *P. ginseng* >> *H. perforatum* - за щамовете *S. thermophilus*;

S. *officinalis* >> *G. sanguineum* > *P. ginseng* ≥ *H. perforatum* – за щамовете *E. faecium*.



А



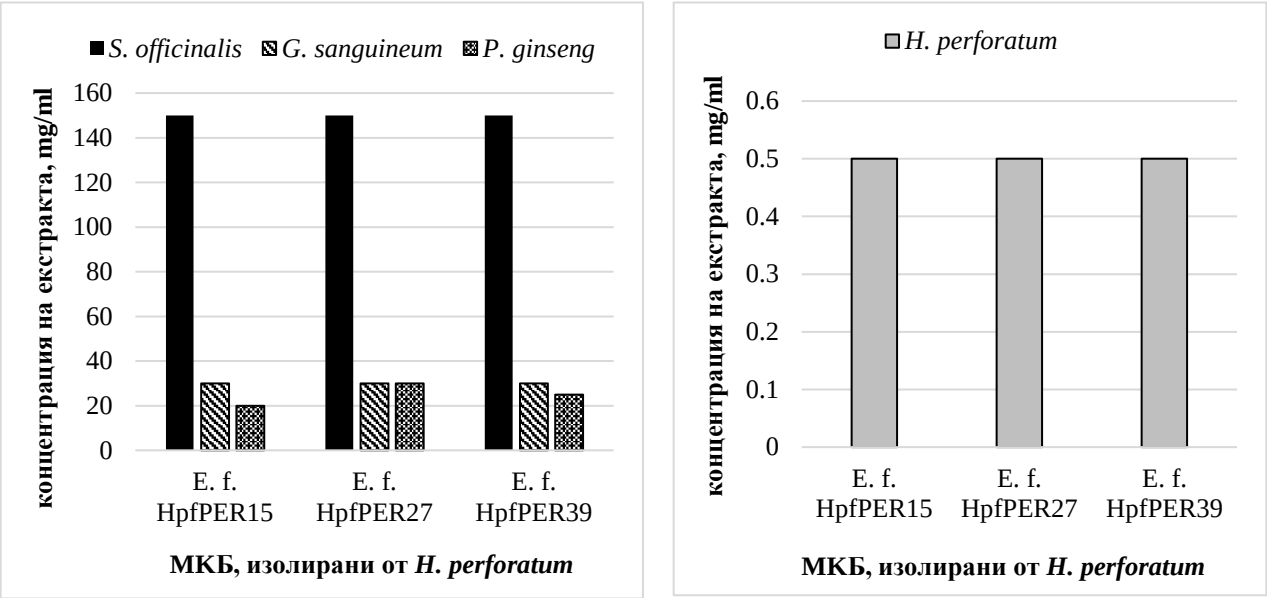
Б

Фиг. 12 (20) Устойчивост на млечнокисели бактерии, изолирани от *G. sanguineum* L., към водно-етанолни екстракти от: А - *Salvia officinalis* L. и *G. sanguineum* L.; Б – *Hypericum perforatum* L. и *Panax ginseng* C.A.Meyer, разтворени в 30% етанол
S. th. – *Streptococcus thermophilus*, E. f. – *Enterococcus faecium*
Представени са концентрациите на растителните екстракти, при които растежът на МКБ не се потиска

5.1.3. Устойчивост на изолирани щамове млечнокисели бактерии от *Hypericum perforatum* L.

Щамовете *E. faecium*, изолирани от *H. perforatum*, проявяват ниска степен на устойчивост към екстракта от *H. perforatum* (концентрации до 0.5 mg/ml) (фиг. 13 (21)). Поведението на изолираните щамовете *E. faecium* от медицинските растения *Salvia* и *G. sanguineum*, към този растителен екстракт също е сходно (фиг. 11 (19), 12 (20)).

А **Б**



Фиг. 13 (21) Устойчивост на млечнокисели бактерии, изолирани от *Hypericum perforatum* L., към водно-етанолни екстракти от: А - *Salvia officinalis* L., *G. sanguineum* L. и *Panax ginseng* C.A.Meyer; Б - *Hypericum perforatum* L., разтворени в 30% етанол
E. f. – *Enterococcus faecium*
Представени са концентрациите на растителните екстракти, при които растежът на МКБ не се потиска

Спрямо екстракта от *S. officinalis*, растежът на *E. faecium* не се инхибира до концентрация 150 mg/ml. Наблюдава се значително по-ниска степен на устойчивост към екстрактите от *G. sanguineum* (до 30 mg/ml) и *P. ginseng* (до 20 mg/ml, 25 mg/ml и 30 mg/ml) (фиг. 13А (21А)). В сравнение с устойчивостта на щамовете *E. faecium*, изолирани от видове *Salvia* и *G. sanguineum*, към екстракт от *P. ginseng* (концентрации до 0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml и 1 mg/ml), щамовете HpfPER15, HpfPER27 и HpfPER39, изолирани от *H. perforatum*, показват по-висока устойчивост (до 20 mg/ml, 25 mg/ml и 30 mg/ml) (фиг. 11 (19), 12 (20), 13 (21)).

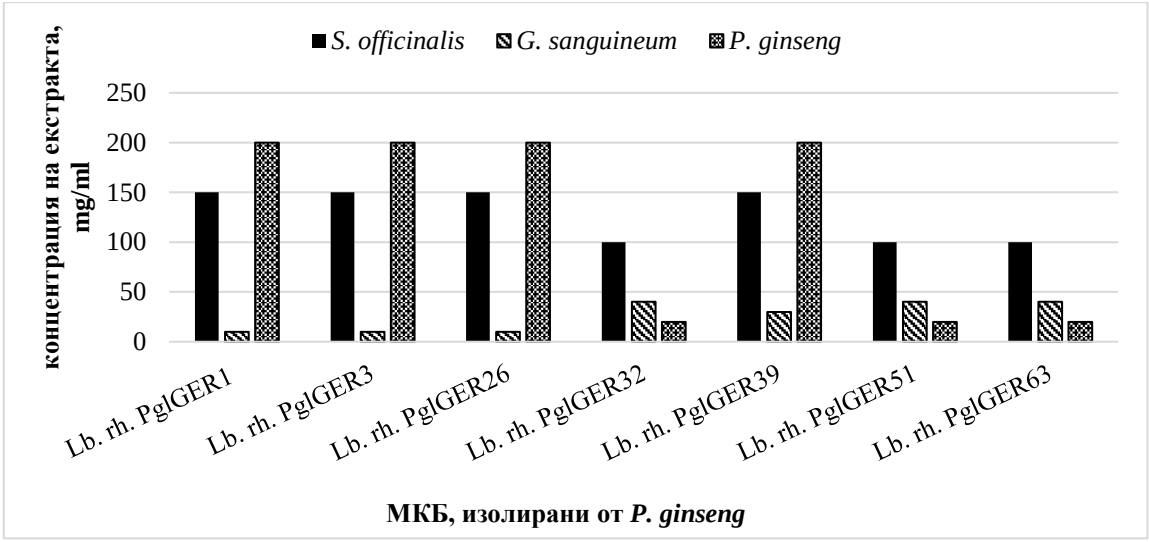
Изследваните три щама *E. faecium* имат еднакъв резистентен профил към изследваните растителни екстракти, т.е устойчивостта и на трите щама е в следната последователност:

S. *officinalis* >> *G. sanguineum* ≥ *P. ginseng* >> *H. perforatum.*

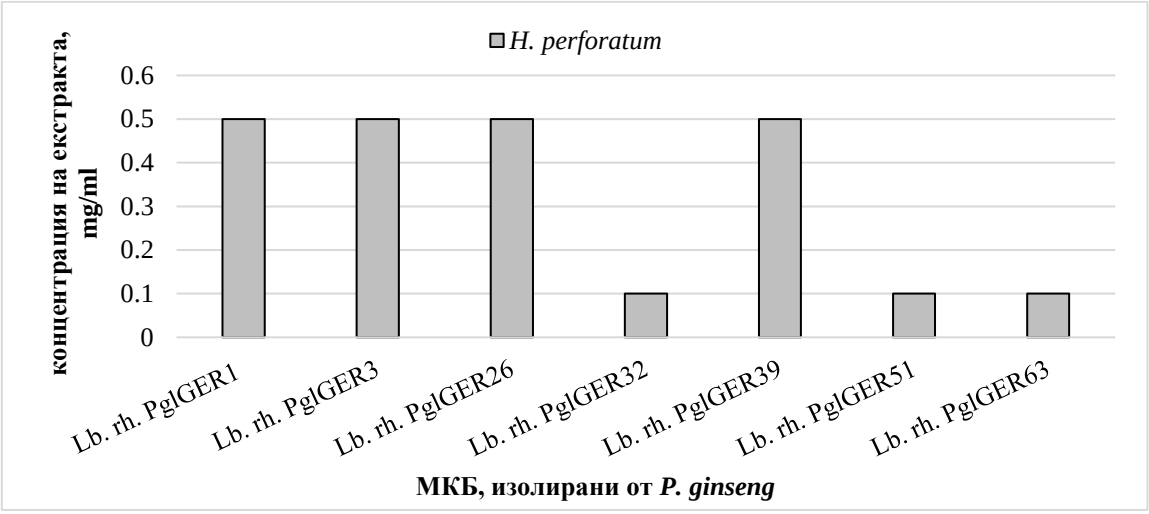
5.1.4. Устойчивост на изолирани щамове млечнокисели бактерии от *Panax ginseng* C.A.Meyer

На фиг. 14 (22) е представена резистентостта на 7 щама *Lb. rhamnosus* към изследваните растителни екстракти. Около 50% от щамовете *Lb. rhamnosus* (PglGER1, PglGER3, PglGER26 и PglGER39) са резистентни към екстракт от *P. ginseng* до концентрация 200 mg/ml, а останалите (PglGER32, PglGER51 и PglGER63) до 20 mg/ml. Лактобацилите проявяват висока степен на устойчивост, спрямо екстракти от *S. officinalis* (при концентрации 150 mg/ml и 100 mg/ml) и значително по-ниска степен на устойчивост към екстракти от *G. sanguineum* (10 mg/ml, 15 mg/ml, 30 mg/ml и 40 mg/ml) (фиг. 14А (22А)). Към екстрактите от *H. perforatum* щамовете показват най-ниска устойчивост (при концентрации 0.1 mg/ml и 0.5 mg/ml) (фиг. 14Б (22Б)).

Установено е различие между щамовете *Lb. rhamnosus*: при щамове PglGER1, PglGER3, PglGER26 и PglGER39 устойчивостта към изследваните екстракти намалява в последователността *P. ginseng* > S. *officinalis* >> *G. sanguineum* >> *H. perforatum*, докато при щамове PglGER32, PglGER51 и PglGER63 - в последователност S. *officinalis* > *G. sanguineum* > *P. ginseng* >> *H. perforatum*.



А



Б

Фиг. 14 (22) Устойчивост на млечнокисели бактерии, изолирани от *Panax ginseng* C.A.Meyer, към водно-етанолни екстракти от: А - *Salvia officinalis* L. и *G. sanguineum* L.; Б - *Hypericum perforatum* L. и *Panax ginseng* C.A.Meyer, разтворени в 30% етанол
Lb. rh. – *Lactobacillus rhamnosus*
Представени са концентрациите на растителните екстракти, при които растежът на МКБ не се потиска

В заключение, изследваните щамове, принадлежащи към видовете *Lb. rhamnosus*, *S. thermophilus*, *Lc. lactis*, *E. faecium*, *E. mundtii* и *E. casseliflavus* показват разнообразен резистентен профил, както към екстракти от растенията, от които са изолирани, така и към екстракти от другите изследвани растения. Всички изследвани щамове проявяват най-добра устойчивост към екстракта от *S. officinalis*, с изключение на *S. thermophilus* SbfGER373, изолиран от *S. blepharophylla*, и 4 щама *Lb. rhamnosus*

(PglGER1, PglGER3, PglGER26 и PglGER39) (фиг. 11 (19), 14 (22)). *S. thermophilus* SbfGER373 е най-устойчив към екстракт от *G. sanguineum* (25 mg/ml) (фиг. 11А (19А)), а *Lb. rhamnosus* (PglGER1, PglGER3, PglGER26 и PglGER39) – към екстракт от *P. ginseng* (от който са изолирани) (200 mg/ml) (фиг. 14А (22А)).

Щамовете *S. thermophilus*, изолирани от *S. blepharophylla* и *G. sanguineum* показват сходна устойчивост към изследваните екстракти, т.е не е установена значителна разлика в поведението на щамовете, изолирани от различни растения. Не е установена и значима разлика между щамовете *Lc. lactis* спрямо изследваните растителни екстракти.

Щамовете *E. faecium*, изолирани от видове *Salvia*, *G. sanguineum* и *H. perforatum*, показват различна устойчивост към изследваните екстракти (фиг. 11 (19), 12 (20), 13 (21)). Всички изследвани щамове са най-резистентни към екстракта от *S. officinalis*, като поведението на щамовете, изолирани от видове *Salvia*, е най-разнообразно (концентрации в диапазона 30-120 mg/ml) (фиг. 11 (19)). Щамовете, изолирани от видове *Salvia* и *G. sanguineum*, показват сходна устойчивост към екстракти от *P. ginseng* и *H. perforatum* (фиг. 11 (19), 12 (20)), докато щамовете, изолирани от *H. perforatum* – сходна устойчивост към екстракти от *G. sanguineum* и *P. ginseng*. Щамовете, изолирани от *H. perforatum*, са с по-висока степен на устойчивост към екстракта от *P. ginseng* (до концентрации 20 mg/ml, 25 mg/ml и 30 mg/ml), в сравнение с останалите ентерококи (до концентрации 0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml и 10 mg/ml) (фиг. 13А (21А)). Щамовете *E. mundtii* и *E. casseliflavus* показват поведение към растителните екстракти, сходно с това на *E. faecium*, изолиран от видове *Salvia* (фиг. 13 (21)).

Въз основа на резистентния профил, може да групираме щамовете *Lb. rhamnosus* в 2 групи, показващи различно поведение към изследваните растителни екстракти:
P. ginseng > S. *officinalis* >> *G. sanguineum* >> *H. perforatum* и
S. *officinalis* > *G. sanguineum* > *P. ginseng* >> *H. perforatum*.

5.2. Устойчивост на млечнокисели бактерии, изолирани от растения, към растителни екстракти, разтворени във вода

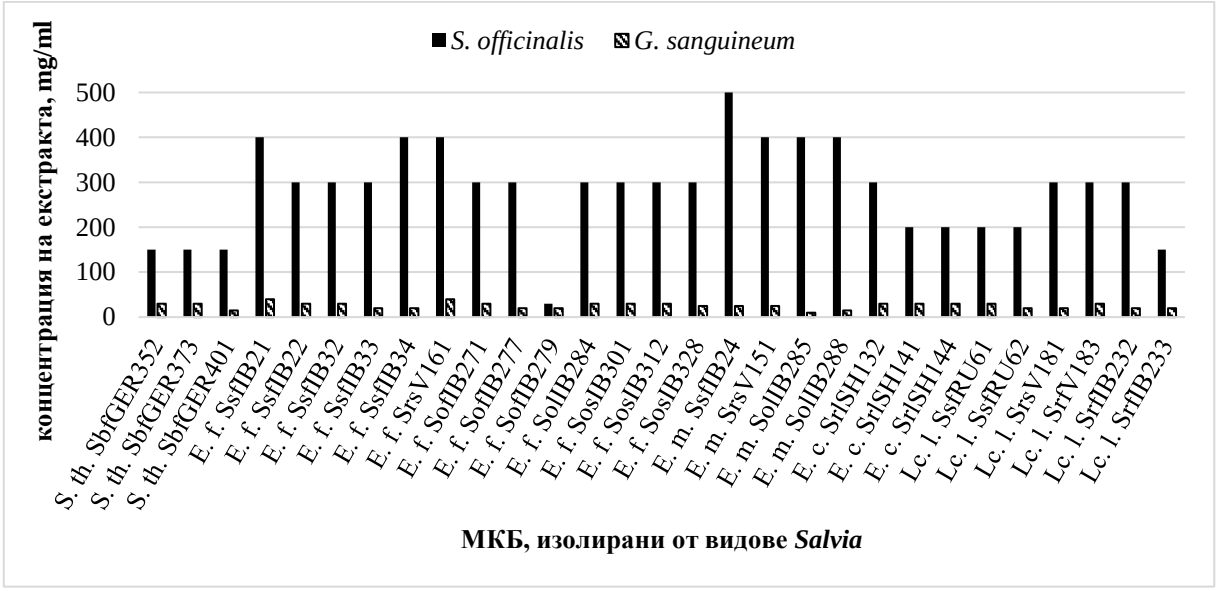
С цел бъдещо приложение на екстракта, съвместно с МКБ, по време на *in situ* култивиране в мляко, използването на вода като разтворител, вместо етанол, би било по-подходящо в хранително-вкусовата промишленост. Получените резултати от изследваната устойчивост на щамовете МКБ, изолирани от растения, към получените водно-алкохолни екстаркти от *S. officinalis*, *G. sanguineum*, *H. perforatum* и *P. ginseng*, разтворени във вода, са представени на Фигури 15 (23), 16 (24), 17 (25) и 18 (26).

На фиг. 15 (23) е показана резистентността на щамовете, изолирани от видове от род *Salvia*. Щамовете *S. thermophilus* показват по-висока устойчивост към екстрактите, разтворени във вода, в сравнение с тези, разтворени в етанол. Изключение прави екстрактът от *G. sanguineum*, чието влияние върху щамовете е почти еднакво. Поведението на трите изследвани щама *S. thermophilus* към екстрактите е сходно, т.е. устойчивостта им е в следната последователност *S. officinalis* >> *G. sanguineum* > *P. ginseng* >> *H. perforatum*.

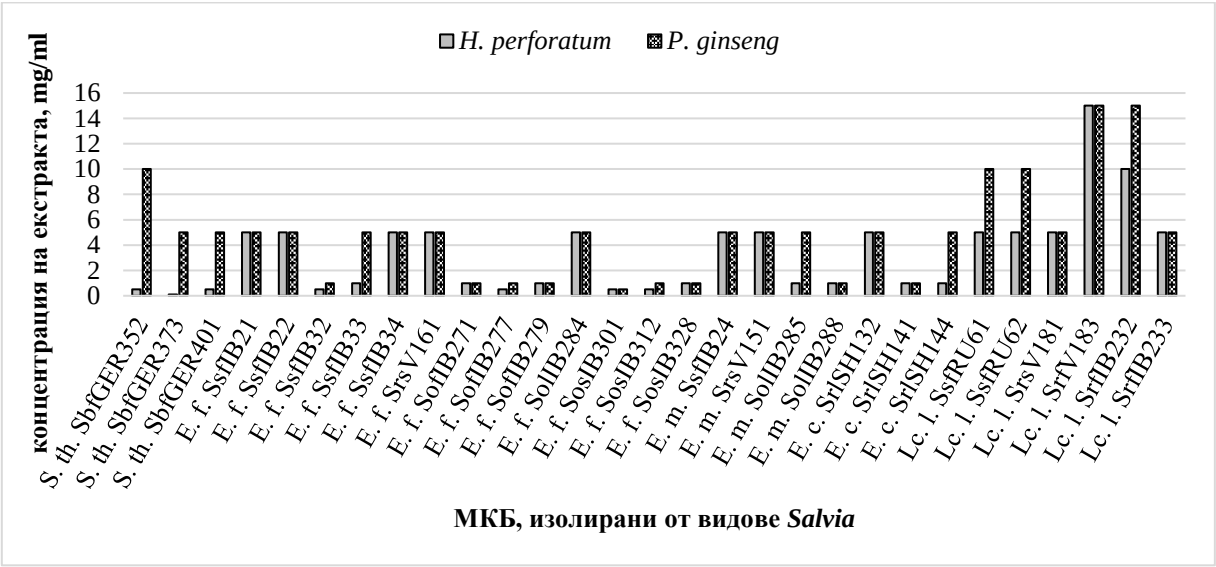
При изследваните щамове *Lc. lactis*, се наблюдава същата тенденция, както при щамовете *S. thermophilus*. *Lc. lactis* проявяви по-висока степен на резистентност към екстрактите от *S. officinalis* (фиг. 15А (23А)), *H. perforatum* и *P. ginseng* (фиг. 15Б (23Б)), разтворени във вода, в сравнение с тези разтворени в етанол, докато екстрактите от *G. sanguineum* иинхибират развитието им в близки концентрации. Влияние на екстрактите от *H. perforatum* и *P. ginseng*, върху растежа на лактококите, е сходно, което не е

валидно за същите екстракти, разтворени в етанол. Поведението на щамовете *Lc. lactis*, към екстрактите, разтворени във вода е сходно, но доказаната резистентост показа разлика с поведението им към екстрактите, разтворени в етанол, т.е. към екстрактите, разтворени във вода, устойчивостта на щамовете е в следната последователност *S. officinalis* >> *G. sanguineum* > *P. ginseng* ≥ *H. perforatum*, докато към тези разтворени в етанол е *S. officinalis* > *G. sanguineum* > *P. ginseng* > *H. perforatum*.

Влиянието на изследваните растителни екстракти върху щамовете *E. faecium, E. mundtii* и *E. casseliflavus*, изолирани от *Salvia*, е сходно (фиг. 15 (23)). Тези щамове показват по-добра резистентност към всички изследвани екстракти, разтворени във вода, в сравнение с тези, разтворени в етанол (фиг. 15 (23); фиг. 11 (19)).



А

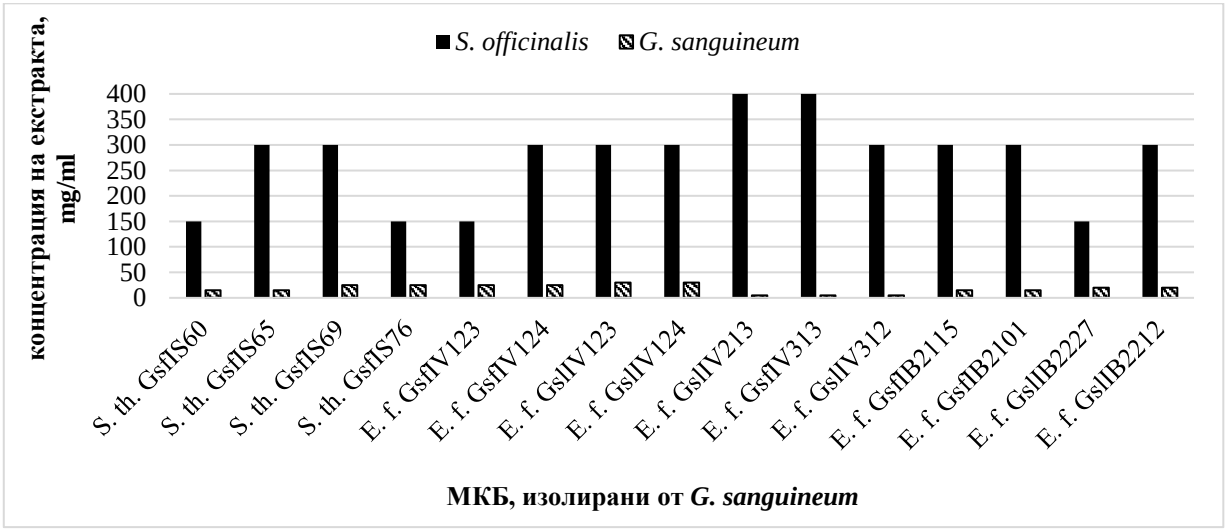


Б

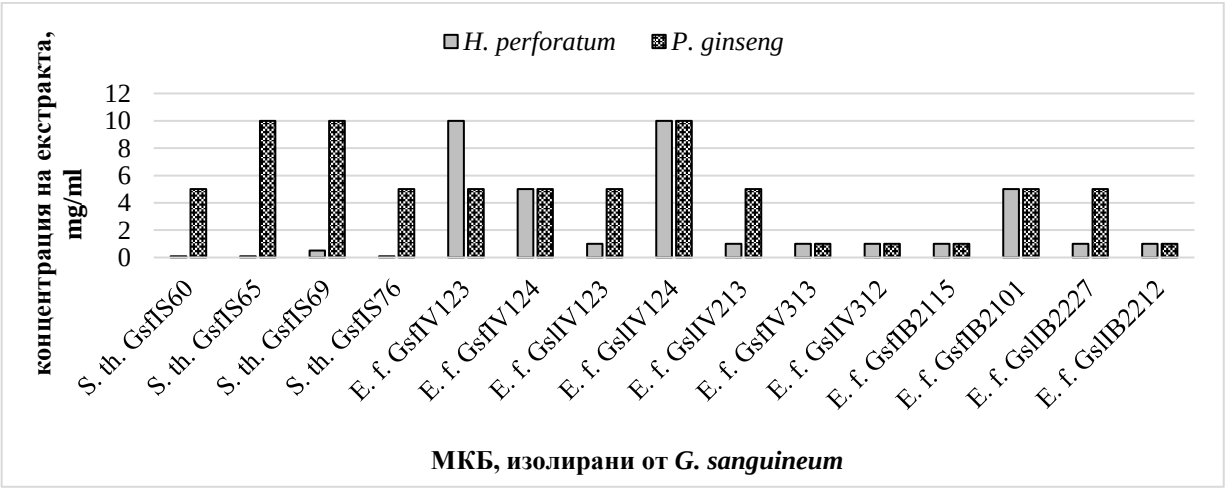
Фиг. 15 (23) Устойчивост на млечнокисели бактерии, изолирани от представители на род *Salvia*, към водно-етанолни екстракти от: А - *Salvia officinalis* L. и *G. sanguineum* L. и Б - *Hypericum perforatum* L. и *Panax ginseng* C.A.Meyer, разтворени във вода.
S. th. – *Streptococcus thermophilus*, Lc. l. – *Lactococcus lactis*, E. f. – *Enterococcus faecium*, E. c. – *Enterococcus casseliflavus*, E. m. – *Enterococcus mundtii*
Представени са концентрациите на растителните екстракти, при които растежът на МКБ не се потиска

Устойчивостта на щамовете *S. thermophilus* и *E. faecium*, изолирани от *G. sanguineum*, е сходна с тази на изследваните щамовете, изолирани от видове *Salvia*. Щамовете проявяват и по-добра резистентност към екстракти от *S. officinalis*, *P. ginseng* и *H. perforatum*, разтворени във вода, в сравнение с екстрактите, разтворени в етанол, а към екстрактите от *G. sanguineum* резистентността им е сходна (фиг. 16 (24), фиг. 12 (20)). Щамовете *S. thermophilus* показват най-висока степен на резистентност към екстракта от *S. officinalis* (фиг. 16А (24А)). Влиянието на екстрактите от *G. sanguineum*, *P. ginseng* и *H. perforatum*, върху развитието на *S. thermophilus* е по-силно, в следствие на което концентрациите, непотискащи растежа им са по-ниски (фиг. 16 (24)).

При щамовете *E. faecium*, резистентостта към екстрактите от *S. officinalis* е до 150 mg/ml (при 18.18% от щамовете), 300 mg/ml (63.64% от щамовете) и 400 mg/ml (18.18% от щамовете) (фиг. 16А (24А)). Към екстрактите от *G. sanguineum* ентерококите проявяват устойчивост в близки концентрации. Резистентността на щамовете *E. faecium* е еднаква към екстрактите от *P. ginseng* и *H. perforatum* (фиг. 16Б (24Б)).



А

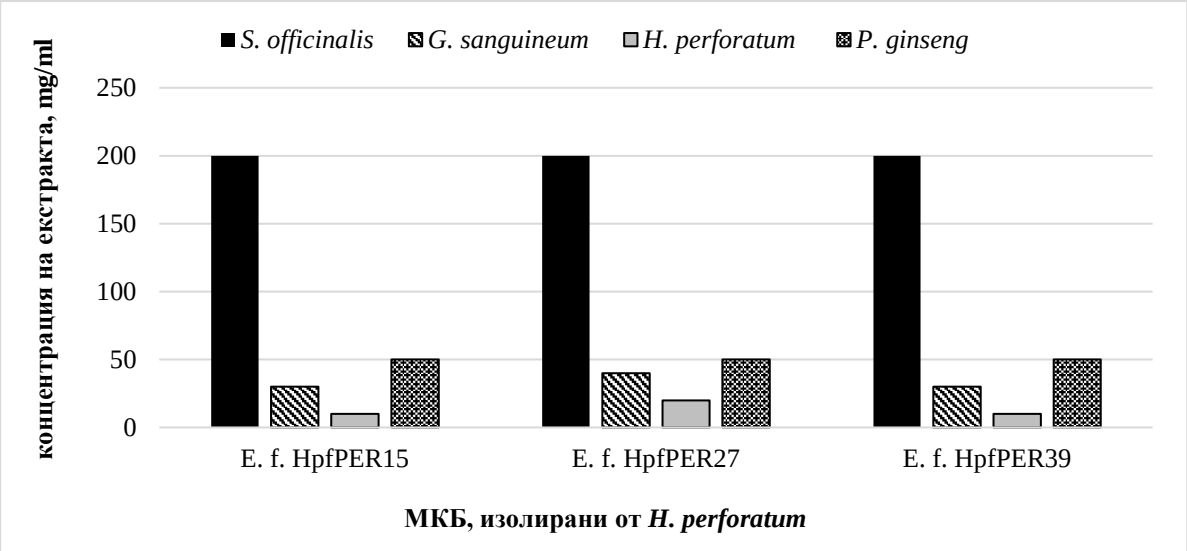


Б

Фиг. 16 (24) Устойчивост на млечнокисели бактерии, изолирани от *G. sanguineum* L., към водно-етанолни екстракти от: А - *Salvia officinalis* L. и *G. sanguineum* L., Б - *Hypericum perforatum* L. и *Panax ginseng* C.A.Meyer, разтворени във вода
S. th. – *Streptococcus thermophilus*, E. f. – *Enterococcus faecium*
Представени са концентрациите на растителните екстракти, при които растежът на МКБ не се потиска

Изолираните от *H. perforatum* щамове *E. faecium* HpfPER15 и HpfPER39, показват сходна резистентност към екстракта от *H. perforatum,* разтворен във вода (10 mg/ml), в сравнение с щамове от същия вид, изолирани от видове *Salvia* и *G. sanguineum* (фиг. 15 (23), 16 (24)), докато щам HpfPER27 прояви резистентност до концентрация 20 mg/ml (фиг. 17 (25)). Щамовете показват висока степен на устойчивост, спрямо екстракта от *S. officinalis*. Резистентността на изследваните ентерококи към екстракти от *H. perforatum*, разтворени във вода, е по-висока с 20-40 пъти, докато към екстрактите от *S. officinalis* и *P. ginseng* само с 1.5 и 2 пъти, в сравнение с резистентността към същите екстракти, разтворени в етанол. При екстрактите от *G. sanguineum*, разтворени във вода или етанол, не е отчетена разлика в резистентността на МКБ. Спрямо екстракта от *P. ginseng* е наблюдавана същата тенденция като при екстрактите, разтворени в етанол, показвайки устойчивост до концентрация 50 mg/ml, което е по-висока концентрация, от тази потискаща развитието на *E. faecium*, изолирани от *G. sanguineum* и видове *Salvia* (1 mg/ml и 10 mg/ml; 0.5 mg/ml и 5 mg/ml).

Изследваните три щама *E. faecium* показват еднакво поведение към изследваните растителни екстракти, но е установена разлика с устойчивостта им към екстрактите, разтворени в етанол, т.е към екстракти, разтворени във вода устойчивостта и на трите щама е в следната последователност: S. *officinalis* >> *P. ginseng* > *G. sanguineum* > *H. perforatum*, а към екстракти разтворени в етанол последователността е: S. *officinalis* >> *G. sanguineum* ≥ *P. ginseng* >> *H. perforatum*.

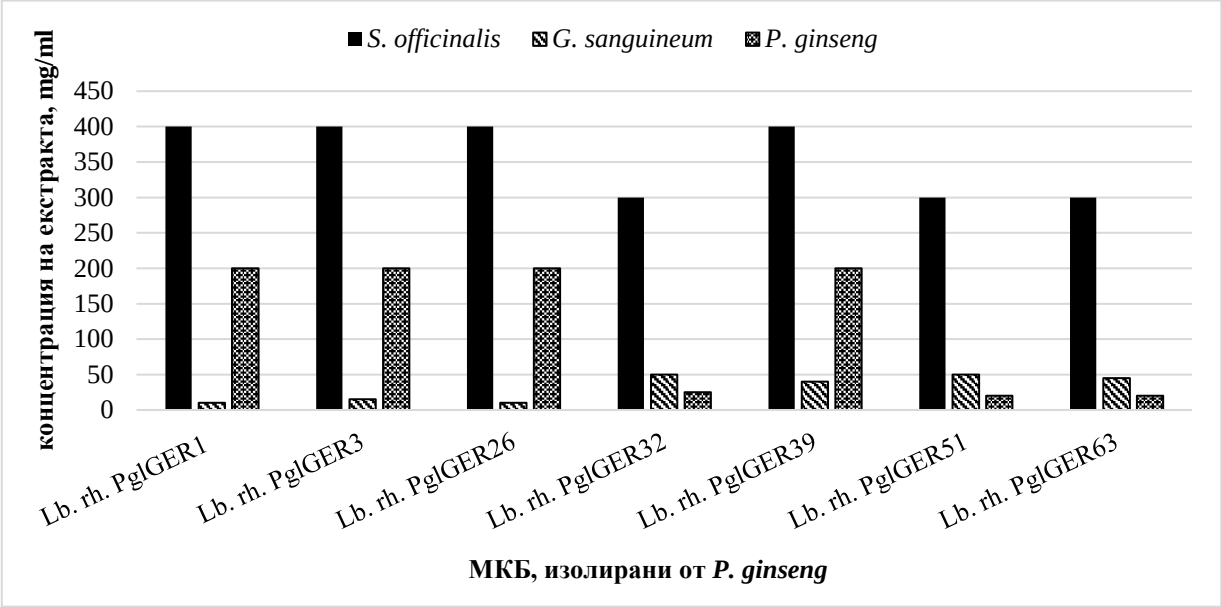


Фиг. 17 (25) Устойчивост на млечнокисели бактерии, изолирани от *Hypericum perforatum* L., към водно-етанолни екстракти от *Salvia officinalis* L., *G. sanguineum* L., *Hypericum perforatum* L. и *Panax ginseng* C.A.Meyer, разтворени във вода
E. f. – *Enterococcus faecium*
Представени са концентрациите на растителните екстракти, при които растежът на МКБ не се потиска

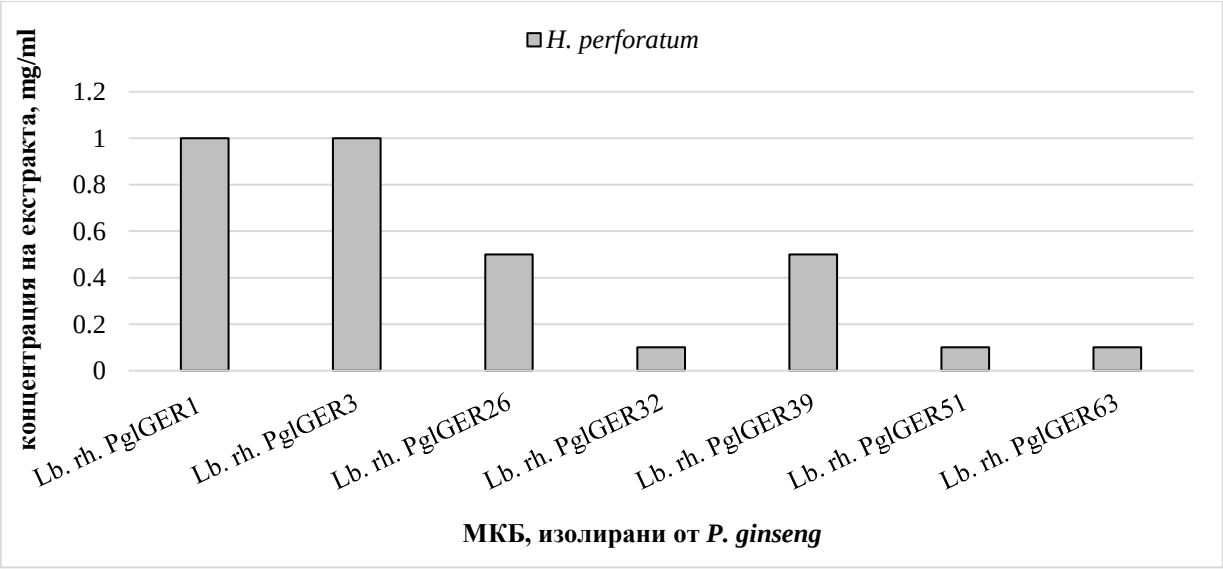
Влиянието на екстрактите от *P. ginseng, G. sanguineum* и *H. perforatum*, разтворени във вода, върху растежа на щамовете *Lb. rhamnosus* се различава минимално от влиянието на екстрактите, разтворени в етанол (фиг. 18 (26)).

Установената резистентност, доказа различие между щамовете *Lb. rhamnosus*, което е доказано и при щамове, тествани срещу екстракти, разтворени в етанол. При щамовете PglGER1, PglGER3, PglGER26 и PglGER39 резистентността към

изследваните екстракти намалява в последователността S. *officinalis* > *P. ginseng* >> *G. sanguineum* >> *H. perforatum*, докато при останалите щамове PglGER32, PglGER51 и PglGER63 - в последователност S. *officinalis* >>*G. sanguineum* > *P. ginseng* >> *H. perforatum*.



А



Б

Фиг. 18 (26) Устойчивост на млечнокисели бактерии, изолирани от *Panax ginseng* C.A.Meyer, към водно-етанолни екстракти на *Salvia officinalis* L., *G. sanguineum* L., *Hypericum perforatum* L. и *Panax ginseng* C.A.Meyer, разтворени във вода
Lb. rh. – *Lactobacillus rhamnosus*
Представени са концентрациите на растителните екстракти, при които растежът на МКБ не се потиска

В заключение, устойчивостта на изследваните щамове от родовете *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* и *Lactobacillus* към екстракта от *S. officinalis*, разтворен във вода, е значително по-висока, от тази към екстракта, разтворен в етанол. 60% от всички щамовете показват сходна устойчивост към екстракта от *G. sanguineum*, разтворен във вода или етанол, а останалите 40% от щамовете – еднаква устойчивост. При щамовете

от родовете *Streptococcus*, *Lactococcus* и *Enterococcus* се наблюдава по-висока степен на устойчивост към екстрактите от *H. perforatum* и *P. ginseng*, разтворени във вода, в сравнение с тези разтворени в етанол, докато резистентността на щамовете от род *Lactobacillus* е еднаква.

5.3. Устойчивост на млечнокисели бактерии, изолирани от млечни продукти, към изследваните растителни екстракти, разтворени в етанол и във вода

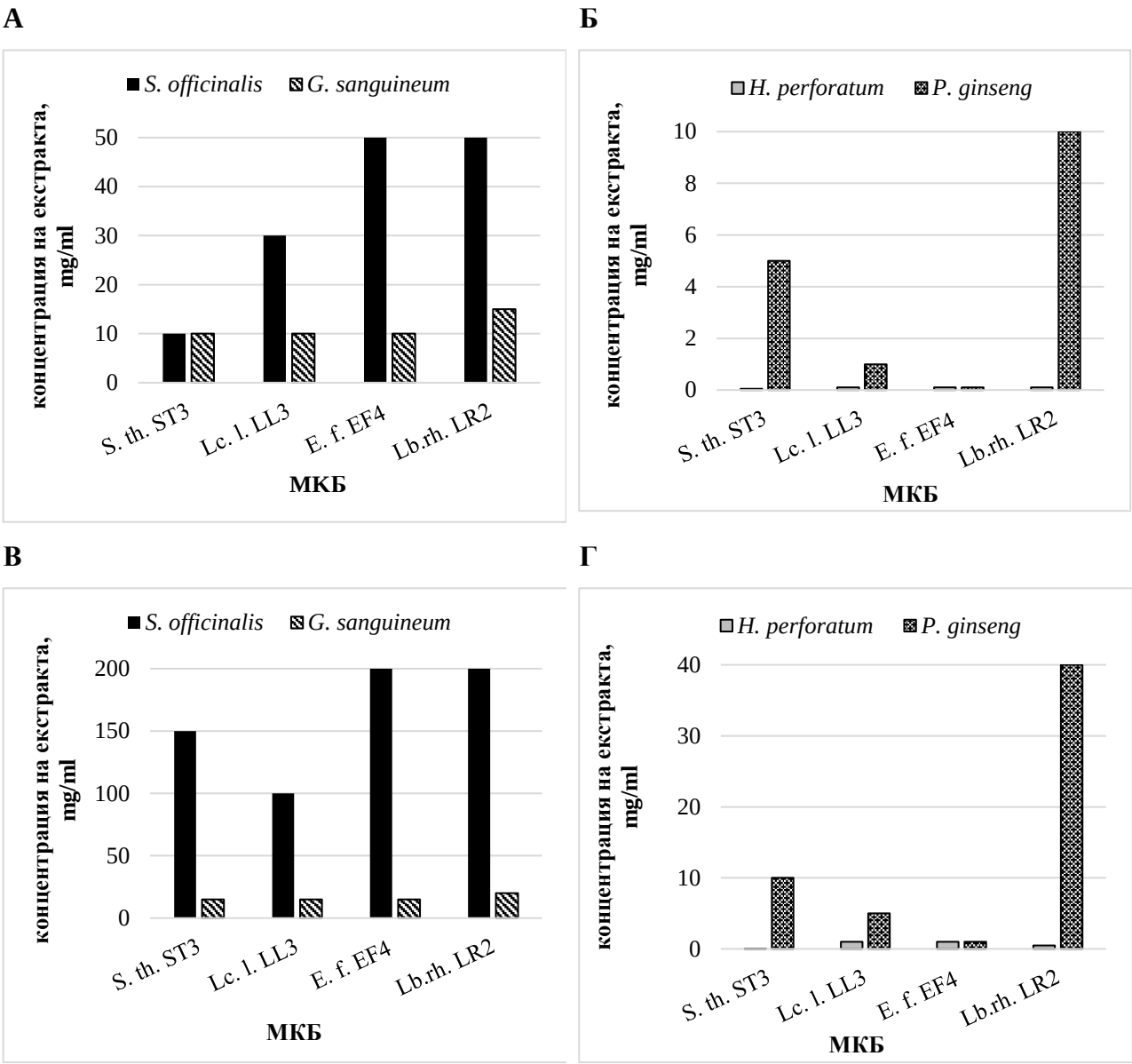
Изследваните растителни МКБ са сравнени с МКБ, изолирани от млечни продукти. На фиг. 19 (27) са представени резултатите от изследваната устойчивост на щамове *S. thermophilus* ST3, *Lc. lactis* LL3, *E. faecium* EF4 и *Lb. rhamnosus* LR2 към екстракти от изследваните растения, разтворени в 30% етанол (фиг. 19А (27А)) и във вода (фиг. 19Б (27Б)).

Спрямо екстрактите, разтворени в етанол, щамовете *S. thermophilus* ST3, *Lc. lactis* LL3, *E. faecium* EF4 и *Lb. rhamnosus* LR2 проявяват сходна устойчивост: най-добра към екстракта от *S. officinalis*, по-слаба към екстракта от *G. sanguineum* и екстракта от *P. ginseng* и най-ниска степен на устойчивост към екстракта от *H. perforatum* (фиг. 19 (27)). Изключение прави щамът *S. thermophilus* ST3, който проявява еднаква степен на устойчивост към екстрактите от *S. officinalis* и *G. sanguineum*, както и *E. faecium* EF4, показвайки еднаква резистентност към екстракти от *H. perforatum* и *P. ginseng* (фиг. 19Б (27Б)).

Спрямо екстрактите, разтворени във вода, щамовете *S. thermophilus* ST3, *Lc. lactis* LL3, *E. faecium* EF4, показват сходна тенденция с екстрактите, разтворени в етанол, т.е устойчивостта следва същата последователност. Изключение прави *E. faecium* EF4, който показва еднаква устойчивост към екстракти от *H. perforatum* и *P. ginseng* (фиг. 19Г (27Г)). Изследваната резистентност на *Lb. rhamnosus* LR2 спрямо екстрактите, разтворени във вода, показва най-висока степен на устойчивост спрямо екстракт от *S. officinalis*, по-слаба към екстракти от *P. ginseng* и *G. sanguineum*, и най-слаба към екстракт от *H. perforatum* (фиг. 19В (27В), 19Г (27Г)).

Изследваните МКБ, от млечен произход, показват по-ниска или сходна устойчивост към изследваните екстракти, в сравненние с растителните щамове МКБ. Всички растителни щамове *S. thermophilus* проявяват по-добра резистентност към екстракти от *S. officinalis* и *G. sanguineum* (разтворени в етанол и във вода) и към *H. perforatum,* разтворен във вода, в сравнение с *S. thermophilus* ST3, като към *H. perforatum,* разтворен в етанол, резистентността е еднаква. 43% от растителните щамове (SbfGER352, GsfIS65 и GsfIS69) проявяват еднаква устойчивост с тази на млечния щам, докато при 57% (SbfGER373, SbfGER401, GsfIS60 и GsfIS76) от растителните щамове устойчивостта е по-слаба, към екстракта от *P. ginseng* (разтворен в етанол и във вода).

Устойчивостта на всички растителните щамове *Lc. lactis* е по-добра, в сравнение с резистентността на млечния *Lc. lactis* LL3 по отношение на екстрактите от *S. officinalis* и *G. sanguineum* (разтворени в етанол и във вода) и към *H. perforatum,* разтворен във вода. Към екстрактите от *H. perforatum* (разтворени в етанол) щамовете SrfV183 и SrfIB232 показват по-добра резистентност, докато останалите щамовете демонстрират еднаква степен на устойчивост с млечния щам. Щамовете SsfRU61, SsfRU62, SrfV183 и SrfIB232 показват по-добра резистентност, към екстрактите от *P. ginseng* (разтворени в етанол и във вода), а щамове SrfV181 и SrfIB233 - еднаква резистентност с млечния щам.



Фиг. 19 (27) Устойчивост на млечнокисели бактерии, изолирани от млечни продукти, към екстракти от *Salvia officinalis* L., *Geranium sanguineum* L., *Hypericum perforatum* L. и *Panax ginseng* C.A.Meyer разтворени в: А и Б - 30% етанол, В и Г – вода Представени са концентрациите на растителните екстракти, при които растежът на МКБ не се потиска

Изследваните резистентни профили, доказват най-разнообразно поведение на щамовете *Enterococcus faecium* към изследваните екстракти, което вероятно се дължи на това, че са изолирани от различни растителни видове и находища. В сравнение с млечния щам *E. faecium* EF4, някои от растителните щамове показват по-добра устойчивост към екстрактите, а други – по-добра към един вид екстракт и еднаква или по-слаба към друг екстракт. Към екстрактите от *S. officinalis* и *G. sanguineum*, разтворени в етанол и вода, около 80% от растителните щамове проявяват по-висока резистентност, а останалите щамове проявяват еднаква или по слаба резистентност, в сравнение с млечния щам. Към екстрактите от *H. perforatum* и *P. ginseng*, разтворени в етанол, всички щамове проявяват по-добра или еднаква устойчивост, в сравнение с млечния щам, като 52% от растителните щамове са по-резистентни към екстрака от *H. perforatum*, а 78% от щамовете - към екстракта от *P. ginseng*. Към тези екстракти,

разтворени във вода, 48% от растителните щамове проявяват по-добра резистентност към *H. perforatum* и 60% - към *P. ginseng,* а останалите растителни щамове проявяват еднаква или по-слаба резистентност.

Всички растителни щамове *Lb. rhamnosus* проявяват по-добра устойчивост към екстракти от *S. officinalis* (разтворени в етанол и във вода) и екстракт от *P. ginseng* (разтворен в етанол), в сравнение с млечния щам *Lb. rhamnosus* LR2. Към останалите изследвани растителни екстракти поведението на щамовете е разнообразно. Към екстракта от *G. sanguineum* и *H. perforatum*, разтворени в етанол и във вода, както и към екстракта от *P. ginseng* (разтворен във вода) 57% от растителните щамове, са по-резистентни, в сравнение с млечния щам, докато останалите щамове показват еднаква или по-слаба резистентност.

В заключение, след изследване на устойчивостта на растителните щамове МКБ (принадлежащи към видовете *Streptococcus thermophilus, Lactococcus lactis, Enterococcus faecium, Enterococcus casseliflavus, Enterococcus mundtii* и *Lactobacillus rhamnosus*) е установено, както междувидово, така и междущамово разнообразие, по отношение на устойчивостта им към изследваните растителни екстракти. Доказан е различен резистентен профил на щамовете *E. faecium*, изолирани от различни растения и находища. В сравнение с млечните щамове МКБ, растителните щамове проявяват по-голяма устойчивост към изследваните екстракти. Всички растителни щамове МКБ проявяват резистентност към растителните екстракти, което доказва потенциал за култивирането им в присъствие на екстрактите и е принос за приложението им в нови функционални ферментирали храни. Поради разнообразния им резистентен профил, към различните растения е трудно да се направи селекция на щамове, показващи най-висока степен на устойчивост към всички изследвани екстракти.

В литературата няма данни за изследване на устойчивостта на млечнокисели бактерии, изолирани от растения към екстрактите от растенията, от които са изолирани. Има публикации, доказващи способността на *S. thermophilus* и *Lb. bulgaricus* да растат и преживяват в присъствие на зелен и черен чай (*Camellia simensis L.*) (Jaziri et al., 2009), при наличието на етерични масла от *Thymus vulgaris, Majorana hortensis* и *Salvia officinalis* (Otaibi and Demerdash, 2008), както и при добавяне на различни растителни екстракти (Michael et al., 2010). Други автори са изследвали способността на различни стартерни и нестартерни МКБ да преживяват в присъствие на зелен чай (Najgebauer-Lejko, 2014; Amirdivani and Baba, 2015).

6. Ферментационни и растежни характеристики на млечнокисели бактерии от растителен и млечен произход при култивиране в мляко

Прилагането на МКБ, изолирани от алтернативни източници, като носители на различни метаболитни активности представлява голям интерес през последните години. Щамове, изолирани от растения, демонстрират толерантност към висока солева концентрация, разширени pH и температурни интервали на развитие, ферментират повече въглехидрати и са по-устойчиви на стрес, в сравнение с тези от млечен произход; също така не се забелязват различия в профилите на ензимите (липази, пептидази и фосфатази), както и във ферментационните характеристики на МКБ (Michaylova et al., 2007; Nomura et al., 2006; Venugopalan et al., 2010; Siezen et al., 2008; Kelly et al., 1998).

На база на досега изследваните характеристики на растителните МКБ - време за коагулация на млякото, синтез на млечна киселина, развитие в широк температурен и pH диапазон, степен на халотолерантност, както и устойчивост към растителни

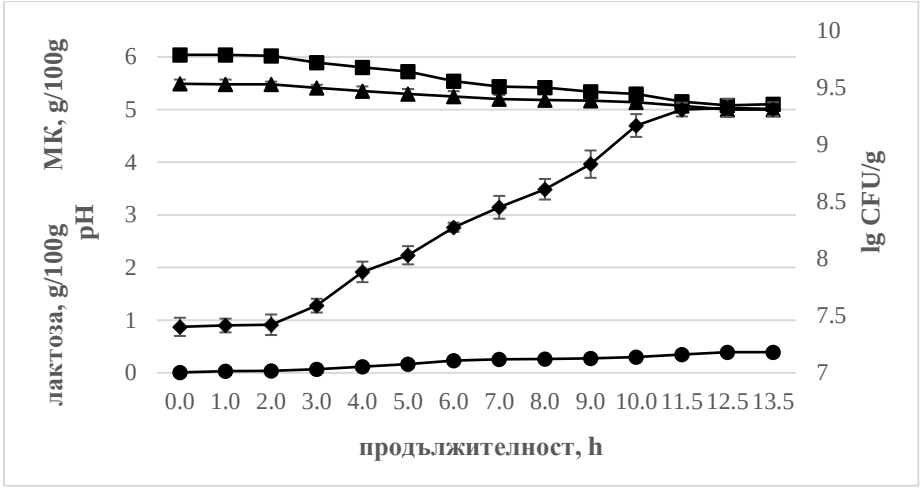
екстракти, са подбрани по един представител от всички видове МКБ, изолирани от растения. Подбраните щамове МКБ са:
- *Lactobacillus rhamnosus* PglGER39 - изолиран от листо на *Panax ginseng* C.A.Meyer;
- *Streptococcus thermophilus* SbfGER352 - изолиран от цвят на *Salvia blepharophylla* Brandegee ex Epling;
- *Lactococcus lactis* SrfV183 - изолиран от цвят на *Salvia ringens* Sibth. & Sm.;
- *Enterococcus faecium* SsfIB21 - изолиран от цвят на *Salvia scabiosifolia* Lam;
- *Enterococcus mundtii* SsfIB24 - изолиран от цвят на *Salvia scabiosifolia* Lam;
- *Enterococcus casseliflavus* SrlSH132 - изолиран от листо на *Salvia ringens* Sibth. & Sm.

С цел приложението на щамовете МКБ, изолирани от билки, при получаване на нови ферментирали продукти, е изследвана способността на щамовете да се развиват в мляко. Изследвани са: усвояване на лактоза, синтез на млечна киселина, изменение на pH и жизнеспособност (брой жизнеспособни клетки), по време на ферментационния процес, както и установяване на времето на коагулация на млякото. Направено е и сравнение с щамове от същите видове, изолирани от млечни продукти - *S. thermophilus* ST3, *Lc. lactis* LL3, *E. faecium* EF4 и *Lb. rhamnosus* LR2, част от колекцията на Лаборатория по приложни биотехнологии.

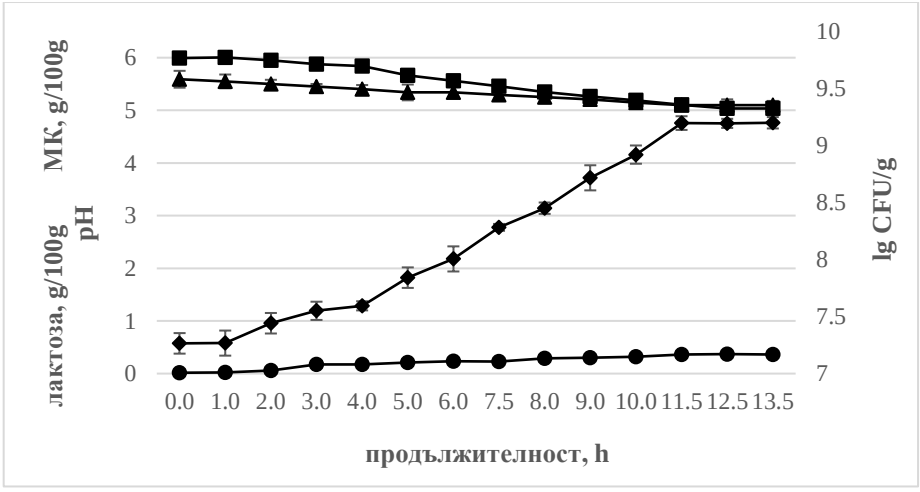
Щамовете *Lb. rhamnosus* не са сред основните компоненти на стартерите за получаване на различни ферментирали млека. Те са включени като допълнителни култури, носители на различни активности, основната сред които е пробиотичната активност. На фиг. 20 (28) е представено развитието на щамове *Lb. rhamnosus* PglGER39 (от растителен произход) и *Lb. rhamnosus* LR2 (от млечен произход). Изследванията показват, че както растителният щам *Lb. rhamnosus,* така и млечният щам коагулират млякото за 11.5 h. И двата щама показват добро развитие, по време на ферментационния процес, т.е увеличението на броя на клетките и на двата щама е от порядъка на 2 lg CFU/g.

По отношение на усвояването на лактоза, синтеза на МК и понижението на pH и двата щама показват сходно поведение. Изследването на остатъчна лактоза в средата доказва, че двата щама *Lb. rhamnosus* усвояват лактоза около 0.5 g/100g (фиг. 20 (28)). Синтезираната млечна киселина, от щамовете *Lb. rhamnosus* PglGER39 и *Lb. rhamnosus* LR2, се увеличава до 12.5 h и достига концентрации 0.39 и 0.36 g/100g. При *Lb. rhamnosus* PglGER39 синтезът на МК започна от 2-ри час, а при *Lb. rhamnosus* LR2 - от 1-ви час (фиг. 20 (28)). Същата тенденция се наблюдава и при промяната на pH, която достига стойности 5.08 (при *Lb. rhamnosus* PglGER39) и 5.04 (при *Lb. rhamnosus* LR2) (фиг. 20 (28)).

При изследването на характеристиките на двата щама, от растителен и млечен произход, по време на ферментация на мляко, не са установени съществени различия по отношение на жизнеспособността на клетките, усвояването на лактоза и синтеза на МК, което е предпоставка за по-нататъчното използване на *Lb. rhamnosus* PglGER39 при получаване на ферментирали млека.



А

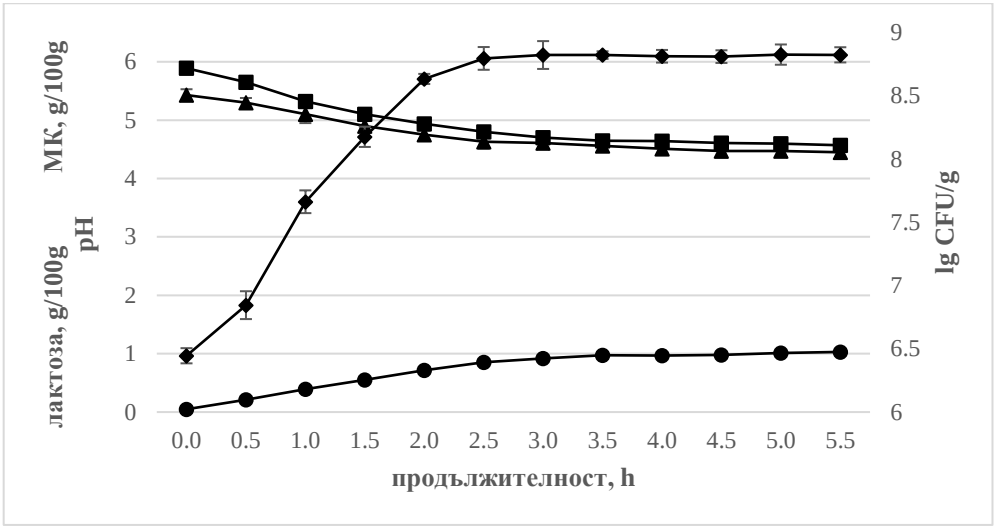


Б

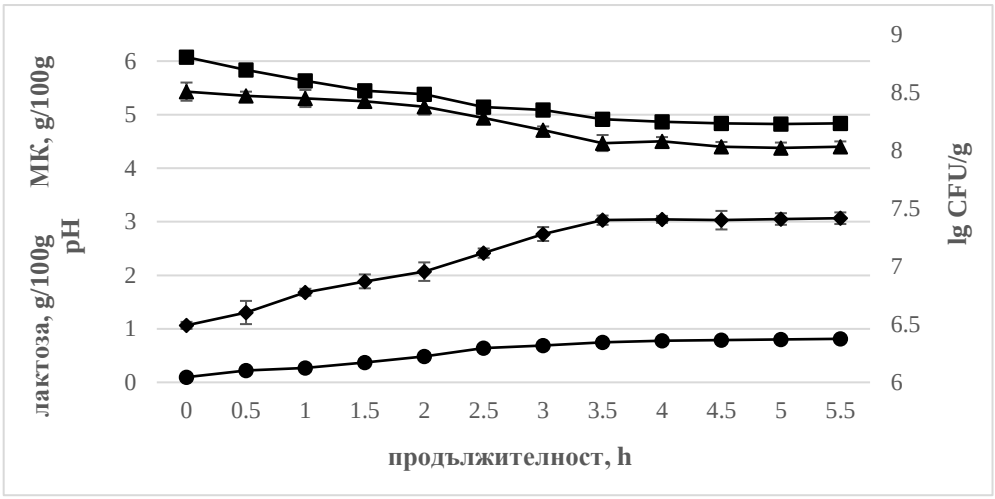
Фиг. 20 (28) Развитие на *Lb. rhamnosus* PglGER39 (А) и *Lb. rhamnosus* LR2 (Б) при 37 °C:
—●— - МК, g/100g;
—▲— - лактоза, g/100g;
—■— - pH;
—◆— - lg CFU/g.
Данните представляват средна стойност ±SD

На фиг. 21 (29) е представено развитието на щамовете *S. thermophilus* SbfGER352 (изолиран от медицински растения) и *S. thermophilus* ST3 (изолиран от млечни продукти), по време на ферментационния процес в мляко. Доказано е, че *S. thermophilus* ST3 коагулира млякото за 3.5 h, а *S. thermophilus* SbfGER352 за 2.5 h. По време на ферментационния процес се наблюдава значителен растеж на *S. thermophilus* SbfGER352 с над 2 lg CFU/g, докато при *S. thermophilus* ST3 растежът е от порядъка на 1 lg CFU/g (фиг. 21 (29)). Доказано е, че и двата щама усвояват около 1.0 g/100g от лактозата в млякото, като процесът е много бърз до момента на коагулация на млякото. При *S. thermophilus* SbfGER352 е наблюдавано бързо увеличение на концентрацията на МК (до 0.98 g/100g) и бърз спад на pH (4.65) до 3.5 h, след което процесите се забавят. В момента на коагулация (2.5 h) на млякото синтезираната МК е 0.85 g/100g и pH е 4.8 (фиг. 21А (29А)). При щам *S. thermophilus* ST3 синтезът на МК и понижението на pH са бързи до момента на коагулация на млякото (МК е 0.65 g/100g, pH 4.92), а след това процесите се забавят (фиг. 21Б (29Б)).

В заключение, растителният щам показва по-добри характеристики, по време на развитие в мляко, в сравнение с млечния: по-кратко време на коагулацията на млякото, по-добър растеж и по-висок синтез на млечна киселина.



А

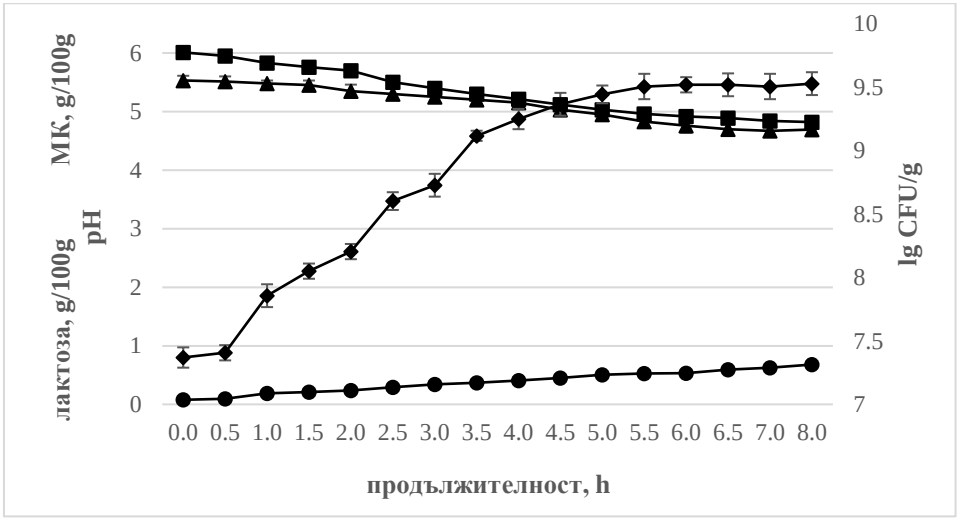


Б

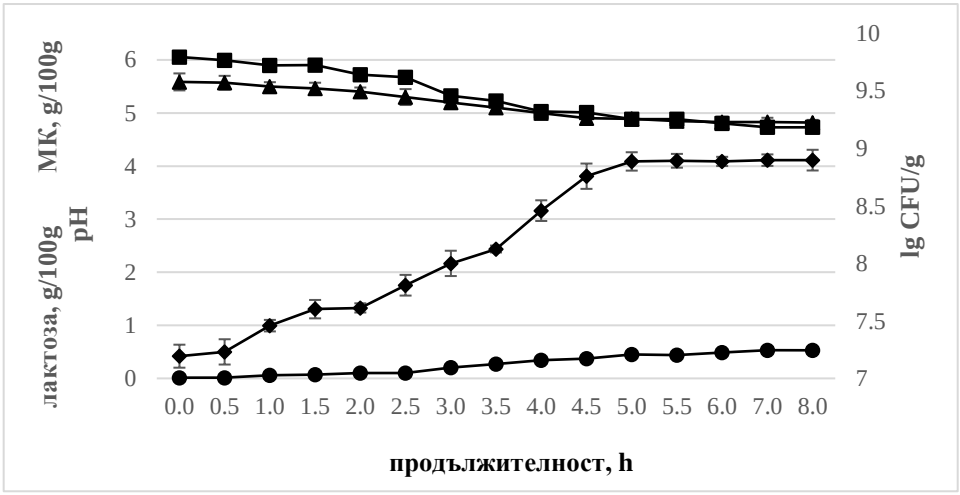
Фиг. 21 (29) Развитие на *S. thermophilus* SbfGER352 (А) и *S. thermophilus* ST3 (Б) при 45 °C:
- МК, g/100g;
- лактоза, g/100g;
- pH;
- lg CFU/g.
Данните представляват средна стойност ±SD

Развитието на *Lc. lactis* SrfV183 (от растителен произход) е сравнено с това на *Lc. lactis* LL3 (от млечен произход) по време на ферментационен процес в мляко (фиг. 22 (30)). Установено е, че растителният щам коагулира млякото за по-дълго време (5.5 h), в сравнение с *Lc. lactis*, изолиран от млечен продукт (5 h). По време на ферментационния процес концентрацията на клетките на *Lc. lactis* SrfV183 се увеличава с над 2 lg CFU/g (фиг. 22А (30А)), докато при щам *Lc. lactis* LL3 се установява растеж от порядъка на 1.7 lg CFU/g (фиг. 22Б (30Б)). След изследването на остатъчната лактоза в средата е установено, че и двата щама усвояват около 0.70 g/100g, до момента на коагулация. При *Lc. lactis* SrfV183 усвояването на лактозата продължава до 6.5 h (1.5 h след коагулация), докато при *Lc. lactis* LL3 то приключва в момента на коагулация (5 h) (фиг. 22 (30)). Синтезът на МК и понижението на pH следват същата зависимост. В момента на коагулация на млякото, синтезираната млечна киселина от *Lc. lactis* SrfV183 (0.53 g/100g) е в по-висока концентрация от синтезираната от *Lc. lactis* LL3 (0.45 g/100g), като достигнатите стойностите на pH са респективно 4.96 и 4.89 (фиг. 22 (30)).

В заключение, растителният щам показва по-дълго време на коагулация на млякото, но по-добър растеж и по-висок синтез на млечна киселина, в сравнение с млечния щам.



А



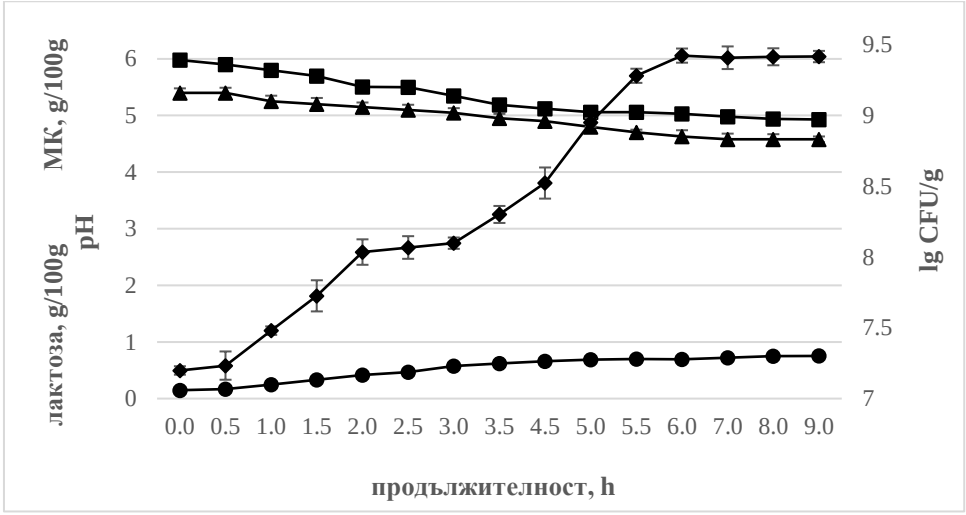
Б

Фиг. 22 (30) Развитие на *Lc. lactis* SrfV183 (А) и *Lc. lactis* LL3 (Б) при 30 °C:
—●— - МК, g/100g;
—▲— - лактоза, g/100g;
—■— - pH;
—◆— - lg CFU/g.
Данните представляват средна стойност ±SD

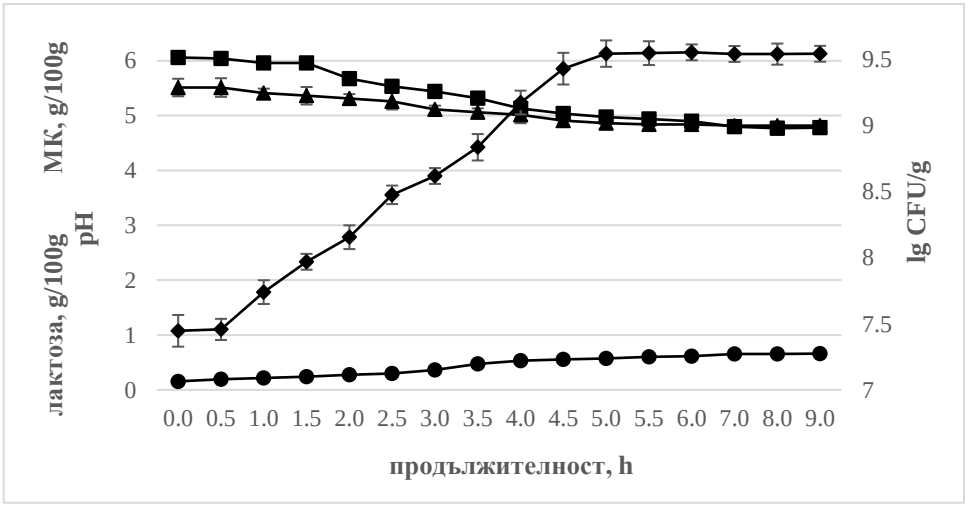
На фиг. 23 (31) е представено развитието на *E. faecium* SsfIB21, изолиран от медицинско растение, и *E. faecium* EF4, изолиран от млечен продукт, по време на ферментационен процес в мляко. Подобно на щамовете *Lc. lactis* е установено, че растителният щам коагулира млякото по-бавно от млечния щам, респективно за 6 часа и 5 часа.

При щам *E. faecium* SsfIB21, концентрацията на клетките се увеличава от $1.58*10^7$ до $2.65*10^9$ CFU/g (от 7.20 до 9.42 lg CFU/g), до момента на коагулация на млякото. Усвоената от щама лактоза е 0.77 g/100g. Щамът синтезира МК в концентрация 0.7 g/100g, достигайки pH 5.03, в момента на коагулация (фиг. 23А (31А)).

За разлика от растителния щам, растежът на щам *E. faecium* EF4 е постоянен, до момента на коагулация на млякото. Титърът се увеличава значително от $2.80*10^7$ до $3.52*10^9$ CFU/g (от 7.45 до 9.55 lg CFU/g). И при двата изследвани щама се наблюдава значителен растеж, около 2 lg CFU/g. Усвоената от щама лактоза, до момента на коагулация, е 0.65 g/100g. Щамът синтезира МК в концентрация 0.57 g/100g, достигайки pH 4.98, в момента на коагулация (фиг. 23Б (31Б)).



А

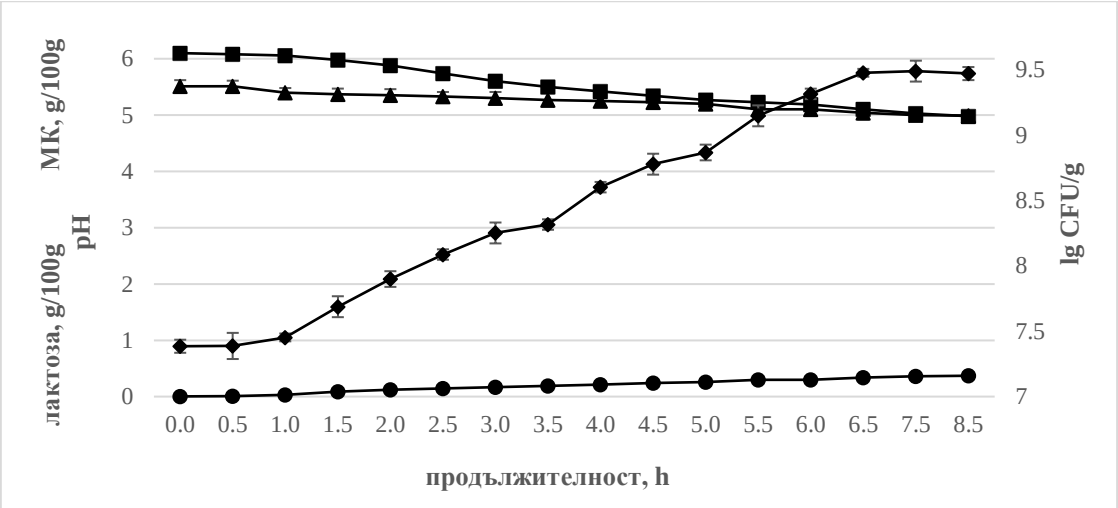


Б

Фиг. 23 (31) Развитие на *E. faecium* SsfIB21 (А) и *E. faecium* EF4 (Б) при 37 °C:
-●- - МК, g/100g;
-▲- - лактоза, g/100g;
-■- - pH;
-◆- - lg CFU/g.
Данните представляват средна стойност ±SD

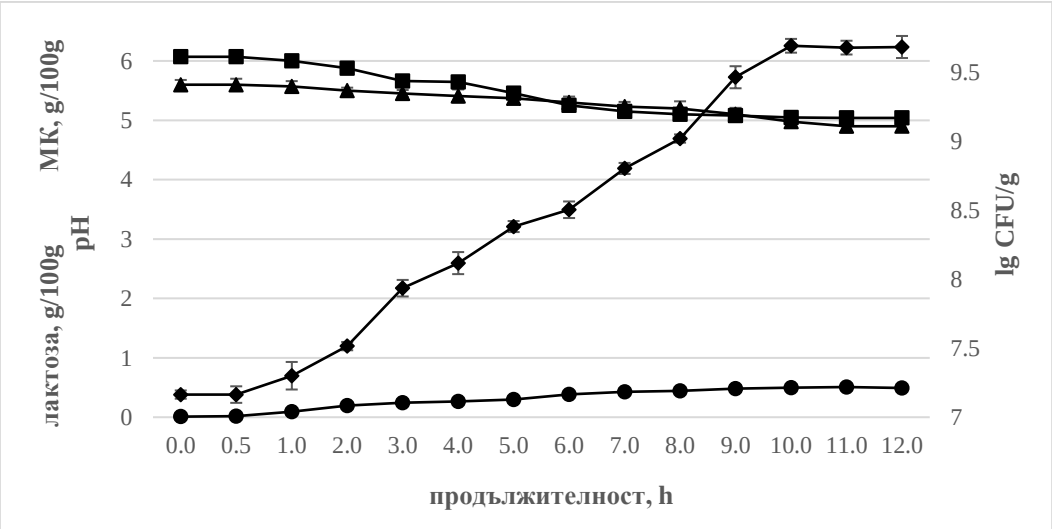
Изследвана е и способността на щамовете *E. mundtii* SsfIB24 и *E. casseliflavus* SrlSH132 да се развиват в мляко (фиг. 24 (32) и 25 (33)). Тези щамове не са сравнени с щамове от същите родове, изолирани от млечни продукти, тъй като те не са типични представители, участващи при получаването на ферментирали млечни продукти, сирена и други.

Щамът *E. mundtii* SsfIB24 коагулира млякото за 6.5 часа, достигайки концентрация на клетките от $2.43*10^7$ до $3.01*10^9$ CFU/g (от 7.39 до 9.48 lg CFU/g). Усвоената, от щама лактоза е около 0.5 g/100g, до момента на коагулация, *E. mundtii* SsfIB24 синтезира ниски количества МК – концентрация 0.3 g/100g (до момента на коагулация), което е типично за ентерококите, които имат слаба подкисляваща способност. Стойностите на pH намаляват плавно, достигайки стойност 5.1, в момента на коагулация (фиг. 24 (32)).



Фиг. 24 (32) Развитие на *E. mundtii* SsfIB24 при 40 °C: —●— - МК, g/100g; —▲— - лактоза, g/100g; —■— - pH; —◆— - lg CFU/g. Данните представляват средна стойност ±SD

Щамът *E. casseliflavus* SrlSH132 има по-дълго време на коагулация на млякото 10 h (фиг. 25 (33)). Концентрацията на клетките нараства плавно до $4.95*10^9$ CFU/g (9.69 lg CFU/g), до момента на коагулация на млякото. Подобно на останалите изследвани щамове, принадлежащи към род *Enterococcus*, *E. casseliflavus* има значителен растеж, т.е увеличение на клетките с около 2 lg CFU/g. Резултатите показват, че щамът усвоява лактоза в концентрация 0.62 g/100g, синтезирайки МК в концентрация 0.50 g/100g и достига pH 5.05, до момента на коагулация (фиг. 25 (33)).



Фиг. 25 (33) Развитие на *E. casseliflavus* SrlSH132 при 37 °C: —●— - МК, g/100g; —▲— - лактоза, g/100g; —■— - pH; —◆— - lg CFU/g. Данните представляват средна стойност ±SD

В заключение, изследваните растителни щамове *Streptococcus thermophilus* SbfGER352, *Lactobacillus rhamnosus* PglGER39, *Lactococcus lactis* SrfV183 и *Enterococcus faecium* SsfIB21 показат по-добри или сходни ферментационни и растежни характеристики при култивиране в мляко, в сравнение с млечните щамове, което доказва техния потенциал за включването им, като компоненти в стартери за получаване на ферментирали млечни продукти.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Млечнокиселите бактерии са широко разпространени микроорганизми в различни екосистеми и продукти. Търсенето на нови решения за усъвършенстване на стартерните системи за здравословни храни и за разширяване на възможностите за най-пълно използване на биологичния потенциал на млечнокиселите бактерии (с по-разнообразен метаболизъм), е предпоставка за експлоатиране на биоразнообразието в уникални природни биосистеми, като лечебните растения.

В настоящата дисертация е представена възможността за използване на медицинските растения, като алтернативен източник за изолиране на млечнокисели бактерии, с по-добри физиологични и биохимични характеристики, в сравнение с тези от млечен произход.

За първи път е изследвано биоразнообразието на млечнокисели бактерии в медицинските растения (*Geranium sanguineum* L., *Hypericum perforatum* L., *Panax ginseng* C.A.Meyer, *Salvia officinalis* L., *Salvia ringens* Sibth. & Sm., *Salvia blepharophylla* Brandegee ex Epling, *Salvia scabiosifolia* Lam. и *Salvia tomentosa* Mill.), като от надземната им част (цвят, листо, стебло) са изолирани, характеризирани и генетично идентифицирани 54 щама МКБ: от *S. blepharophylla* - *S. thermophilus*, от *S. officinalis* – *E. faecium* и *E. mundtii*, а от *S. ringens* – *Lc. lactis, E. faecium, E. casseliflavus* и *E. mundtii, S. scabiosifolia* – *Lc. lactis, E. faecium* и *E. mundtii*; от *G. sanguineum* L. - *S. thermophilus* и *E. faecium*; от *H. perforatum* – *E. faecium*; от *P. ginseng* – *Lb. rhamnosus.* Резултатите доказват, че изследваните растения са подходяща екологична ниша за изолиране на МКБ, с изключение на *S. tomentosa* Mill.

Растителните МКБ показват способност за развитие в по-широк температурен и pH диапазон, както и по-висока степен на халотолерантност, в сравнение с МКБ от млечен произход. Доказаната устойчивост на растителните МКБ към екстракти от изследваните растения, потвърждава възможността за култивирането им в присъствие на растителни екстракти, които са доказани носители на биологично активни вещества и активности. Получените резултати са база за създаване на нови ферментирали продукти с повичени хранителни и здравни ползи, чрез култивиране на растителните МКБ в присъствие на екстракти при *in situ* култивиране в мляко.

Доказаните по-добри или сходни ферментационни и растежни характеристики при култивиране в мляко, на изследваните растителни щамове *Streptococcus thermophilus* SbfGER352, *Lactobacillus rhamnosus* PglGER39, *Lactococcus lactis* SrfV183 и *Enterococcus faecium* SsfIB21, в сравнение с млечни щамове, са предпоставка за включването им, като компоненти в стартери за получаване на ферментирали млечни продукти.

В заключение, изследвайки биоразнообразието на млечнокисела микрофлора в медицинските растения, изолирането, идентифицирането и характеризирането на растителните МКБ е нов подход за формиране на разнообразни стартерни съобщества за създаване на иновативни хранителни матрици за функционални ферментирали млечни храни.

ИЗВОДИ

1. Цветовете на изследваните медицински растения, с изключение на *Panax ginseng* C.A.Meyer, са най-предпочитана надземна част за обитание на МКБ.
2. С най-висока киселинопродуцираща активност са МКБ, изолирани от видове *Salvia*, последвани от *G. sanguineum*, *H. perforatum* и *P. ginseng*. В групата на растителните МКБ, преобладават продуциращите L(+)-МК (85.45%) и това е единственият изомер, продуциран при МКБ от *Hypericum perforatum* L. и *Panax ginseng* C.A.Meyer, докато МКБ от *Geranium sanguineum* L. и видове *Salvia* са продуценти на L(+)-МК и D(-)/L(+)-МК.
3. Изолираните растителни МКБ показват способност за развитие в по-широк температурен и pH диапазон, както и по-висока степен на халотолерантност, в сравнение с млечнокисели бактерии от млечен произход.
4. С помощта на полифазно-таксономичен подход са доказани родовете *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* и *Lactobacillus*, като микрофлора на лечебните растения:
    - 4.1. *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus casseliflavus* и *Enterococcus mundtii* – микрофлора на *Salvia officinalis* L., *Salvia ringens* Sibth. & Sm., *Salvia blepharophylla* Brandegee ex Epling, *Salvia scabiosifolia* Lam.;
    - 4.2. *Streptococcus thermophilus* и *Enterococcus faecium* – микрофлора на *Geranium sanguineum* L.;
    - 4.3. *Enterococcus faecium* – микрофлора на *Hypericum perforatum* L.;
    - 4.4. *Lactobacillus rhamnosus* – микрофлора на *Panax ginseng* C.A.Meyer.
5. Най-разнообразна млечнокисела микрофлора (*Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus mundtii*) се доказва при *S. ringens*.
6. Водно-алкохолните екстракти от *H. perforatum* L., *G. sanguineum* L. и *S. officinalis* L. съдържат високи концентрации на общи феноили (106.00 ± 1.53 mgGAE/g CE, 105.00 ± 1.41 mgGAE/g CE и 97.00 ± 1.41 mgGAE/g CE, респективно), а екстрактът от *P. ginseng* C.A.Meyer – ниска концентрация на общи феноили (1.56 ± 0.23 mgGAE/g CE).

7. Най-добра антиоксидантна активност е отчетена с ABTS метода, като с най-висока активност е *G. sanguineum* L. (4518.81 ± 16.73 mMTE/g CE), следван от *H. perforatum* L. (2566.62 ± 10.04 mMTE/g CE), *S. officinalis* L. (1191.02 ± 5.02 mMTE/g CE) и *P. ginseng* C.A.Meyer (29.26 ± 0.59 mMTE/g CE).
8. Всички растителни щамове МКБ проявяват устойчивост към екстрактите от *Geranium sanguineum* L., *Hypericum perforatum* L., *Panax ginseng* C.A.Meyer, *Salvia officinalis* L., като е доказана видова и щамова специфичност на изследваните МКБ.
9. Установени са по-добри или сходни ферментационни и растежни характеристики, при култивиране в мляко, на растителните щамове *Lactobacillus rhamnosus* PglGER39, *Streptococcus thermophilus* SbfGER352, *Lactococcus lactis* SrfV183 и *Enterococcus faecium* SsfIB21, в сравнение с МКБ от млечен произход.

ПРИНОСИ

1. За първи път е изследвано биоразнообразието на млечнокисели бактерии в медицинските растения *Geranium sanguineum* L., *Hypericum perforatum* L., *Panax ginseng* C.A.Meyer, *Salvia officinalis* L., *Salvia ringens* Sibth. & Sm., *Salvia blepharophylla* Brandegee ex Epling, *Salvia scabiosifolia* Lam. и *Salvia tomentosa* Mill., от различни находища.
2. Доказана е перспективността на лечебните растения, като източник за изолиране на млечнокисели бактерии, с подобрени физиологични и биохимични характеристики, което е предимство за бъдещото им включване в стартерни съобщества за получаване на нови ферментирали храни.
3. Изолирани и идентифицирани са представители от родовете *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* и *Enterococcus*, устойчиви към екстракти от *Geranium sanguineum* L., *Hypericum perforatum* L., *Panax ginseng* C.A.Meyer и *Salvia officinalis* L.
4. Растителните млечнокисели бактерии са перспективни за култивиране в среда, обогатена с растителни екстракти, носители на биологични активности, за получаване на ферментирали продукти, с повишени здравни ползи.

5. Депозирани са 54 секвенции, което е принос в информацията за генетичното разнообразие на млечнокиселите бактерии от слабопроучен хабитат, какъвто са лечебните растения.
6. Създадена е колекция от млечнокисели бактерии, изолирани от медицинските растения *Geranium sanguineum* L., *Hypericum perforatum* L., *Panax ginseng* C.A.Meyer и видове *Salvia*, с повишени физиологични и биохимични характеристики.

ПУБЛИКУВАНИ МАТЕРИАЛИ

Публикация в международни научни списания:

Teneva-Angelova Ts., Beshkova D. (2015) Genus *Salvia* – ecosystem for isolation of lactic acid bacteria. J Microbiol Biotech Food Sci, 5(2):103-108.

Teneva-Angelova Ts., Beshkova D. (2016) Non-traditional sources for isolation of lactic acid bacteria. Annals of Microbiology, 66(1):449-459. (IF 2016 – 1.122)

Teneva-Angelova Ts., Hristova I., Pavlov A., Beshkova D. (2017) Lactic acid bacteria – From nature through food to health. In: Advances in Biotechnology for Food Industry, 1st Edition, Grumezecu, A. and Holban, A.M. (Eds), Volume 14, Chapter 4, 472 pp. ISBN: 9780128114438

Публикация в българско научно списание или тематичен сборник:

Teneva Ts., Beshkova D., Marchev A., Nikolova M., Frengova G., Pavlov A. (2014) *Geranium sanguineum* L. - an alternative source for isolation of lactic acid bacteria. Ecolog. Eng. Environ. Prot., 1:4-11.

Доклад пред научно мероприятие в страната:

Тенева-Ангелова Ц., Френгова Г., Бешкова Д. *Panax ginseng* – an unconventional source for isolation of lactic acid bacteria. 68 години Институт по Микробиология Стефан Ангелов и 10 години асоциран с Институт Пастьор – Париж, 2015, 16-17 Март, София, България

Доклад пред научно мероприятие в чужбина или пред международно научно мероприятие у нас:

Teneva Ts., Beshkova D., Marchev A., Nikolova M., Frengova G., Pavlov A. *Geranium sanguineum* L. - an alternative source for isolation of lactic acid bacteria. III national conference with international participation „Ecological engineering and environment protection”, June 13-14, 2013, Sofia, Bulgaria.

Teneva Ts., Beshkova D., Nikolova M., Frengova G., Pavlov A. Medicinal plants-ecosystem for isolation of lactic acid bacteria. Microbiologia balkanica, 8th Congress of Microbiology, October 2-5, 2013. Veliko Tarnovo, Bulgaria.

Teneva Ts., Beshkova D., Pavlov A. From natural plant habitats to discovering of lactobacteria. International Conference on Natural Products Utilization: From Plants to Pharmacy Shelf, November 3-6, 2013, Bansko, Bulgaria.

Teneva - Angelova Ts., Beshkova D., Frengova G. Screening of plant-related lactic acid bacteria from natural ecological niche. 13th Congress of Microbiologists in Bulgaria with International Participation, October 7-10, 2014, Tryavna, Bulgaria.

Teneva-Angelova Ts., Beshkova D. Resistance profile of plant-derived lactic acid bacteria against herb extracts. International Conference of the University of Agronomic Sciences and Veterinary Medicine „Agriculture for Life - Life for Agriculture“, June 04-06, 2015, Bucharest, Romania.

Teneva-Angelova Ts., Beshkova D. Study of inhibition effect of herbal extracts over viability of plant-derived lactic acid bacteria. International Conference on Natural Products Utilization: From Plants to Pharmacy Shelf, October 14-17, 2015, Plovdiv, Bulgaria.

Teneva-Angelova Ts., Yoanidu K., Panayotov P., Beshkova D. Comparative analysis of coagulation process of lactic acid bacteria, isolated from traditional and alternative sources. XIth scientific conference with international participation „Ecology and health”, June 9-10, 2016, Plovdiv, Bulgaria.

Beshkova D., **Teneva-Angelova Ts.,** Georgiev V., Pavlov A. Biodiversity of lactic acid microbiota in plant ecosystems. International scientific conference “Microbiology for better health and industry – 70 years the Stephan Angeloff Institute of Microbiology”, March 14-15, 2017, Sofia, Bulgaria.

Teneva-Angelova Ts., Yoanidu K., Panayotov P., Beshkova D. Influence of lactic acid bacteria from alternative sources in the formation of starter communities. Vth international conference „Ecological engeneering and environment protection”, June 5-7, 2017, Plovdiv, Bulgaria.

Teneva-Angelova Ts., Yoanidu K., Beshkova D. Evaluation of plant-derived lactic acid bacteria resistance against crude plant extracts. Microbiologia balkanica, 10th Balkan Congress of Microbiology, November 16 -18, 2017, Sofia, Bulgaria.

Депозирани са <u>54 секвенции</u> в NCBI GenBank.

НАГРАДИ

1. **Най-добър постер на млад учен**

Teneva - Angelova Ts., Beshkova D., Frengova G. Screening of plant-related lactic acid bacteria from natural ecological niche. 13th Congress of Microbiologists in Bulgaria with International Participation, October 7-10, 2014, Tryavna, Bulgaria.

Teneva-Angelova Ts., Yoanidu K., Beshkova D. Evaluation of plant-derived lactic acid bacteria resistance against crude plant extracts. Microbiologia balkanica, 10th Balkan Congress of Microbiology, November 16 -18, 2017, Sofia, Bulgaria. (II place)

2. **Награда за отлични научни изследвания**

Teneva-Angelova Ts., Yoanidu K., Panayotov P., Beshkova D. Influence of lactic acid bacteria from alternative sources in the formation of starter communities. Vth international conference „Ecological engeneering and environment protection”, June 5-7, 2017, Plovdiv, Bulgaria.

СПЕЦИАЛИЗАЦИИ

април/май 2014: Лаборатория Валенберг, Гьотеборгски университет, Швеция. „Идентификация на бактериални изолати чрез методите на молекулярната биология“

УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ПРОЕКТИ

2016 – 2017:
Получаване на ферментирали млечни продукти с повишена биологична стойност. ДФНП-62/27.04.2016.
Финансиран по Програма за подпомагане на младите учени в БАН.
Ръководител ас. Цветанка Тенева-Ангелова
2011 – до сега:
Интегрирани биологични системи за получаване на изохинолинови алкалоиди от представители на род *Fumaria* и техни модифицирани чрез микробна трансформация производни. DMU-03/77-2011.
Финансиран от МОМН- ФНИ.
Ръководител доц. д-р Иван Иванов

SUMMARY

Lactic acid bacteria (LAB) are widespread microorganisms in different ecosystems and products. The search for new solutions, in order to improve the starter systems for healthy foods and for expanding the possibilities for the fullest use of the biological potential of lactic acid bacteria (with more diverse metabolism) is a prerequisite for exploitation of biodiversity in unique natural biosystems, such as medicinal plants.

In the current thesis is presented the possibility of using medicinal plants as an alternative source for isolation of lactic acid bacteria with better physiological and biochemical characteristics, compared to these of dairy origin.

For the first time is studied the biodiversity of lactic acid bacteria in medical plants (*Geranium sanguineum* L., *Hypericum perforatum* L., *Panax ginseng* C.A.Meyer, *Salvia officinalis* L., *Salvia ringens* Sibth. & Sm., *Salvia blepharophylla* Brandegee ex Epling, *Salvia scabiosifolia* Lam. and *Salvia tomentosa* Mill.), such as from the aerial part of the plants (flower, leaf, stem) are isolated, characterized and genetically identified 54 strains LAB: from *S. blepharophylla* - *S. thermophilus*, from *S. officinalis – E. faecium* and *E. mundtii*, and from *S. ringens – Lc. lactis*, *E. faecium*, *E. casseliflavus* and *E. mundtii*, *S. scabiosifolia – Lc. lactis*, *E. faecium* and *E. mundtii*; from *G. sanguineum* L. - *S. thermophilus* and *E. faecium*; from *H. perforatum – E. faecium*; from *P. ginseng – Lb. rhamnosus*. The results prove that the studied plants are a suitable ecological niche for the isolation of lactic acid bacteria, except for *S. tomentosa* Mill.

Plant-derived LAB demonstrate ability to grow in a wide temperature and pH range, as well as at a higher level of halotolerance in comparison to LAB of dairy origin. The proven resistance of plant-derived LAB against extracts of the studied plants confirms the possibility of their cultivation in the presence of plant extracts, which are proven carriers of biologically active substances and activities. The obtained results are a basis for creation of new fermented products with increased nutritional and health benefits, by cultivation of plant-derived LAB in the presence of extracts during *in situ* cultivation of milk.

Proven better or similar fermentation and growth characteristics in milk cultivation of the studied plant-derived strains *Streptococcus thermophilus* SbfGER352, *Lactobacillus rhamnosus* PglGER39, *Lactococcus lactis* SrfV183 and *Enterococcus faecium* SsfIB21 in comparison to dairy strains, are a prerequisite for their incorporation as components in starters, for the production of fermented dairy products.

In conclusion, studying of biodiversity of lactic acid microflora in medicinal plants, isolation, identification and characterization of plant-derived LAB is a new approach for formation of diverse starter communities, in order to create innovative food matrices for functional fermented dairy foods.