

До
Секцията по Обща микробиология
към Институт по микробиология „Стефан Ангелов“
при Българската Академия на Науките

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд „Ко-агрегация между щамове *Bacillus subtilis* и
Escherichia coli K-12 и образуване на смесени биофилми“

от Иво Тодоров Ганчев,

представен за придобиване на образователната и научна степен “Доктор” по
професионално направление 4.3. „Биологически науки” (Микробиология)

Рецензент: проф. д-р Жечко Панайотов Димитров

Дисертационният труд на Иво Ганчев е в областта на микробиологията и е посветен на проучване на ко-агрегацията при взаимодействието на щамове *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli* K-12 и влиянието на различни фактори върху ко-агрегационните взаимодействия. Изследвани са процесите на образуване на смесени биофилми, както и влиянието на редица фактори, включително и на метаболитни продукти от подбрани щамове с потенциален пробиотичен ефект, върху образуването и стабилността на биофилмите. Биофилми могат да се образуват по мукусната повърхност на дебелото черво, по зъбния емайл, по повърхности на производствени съоръжения. В редица случаи има риск от образуване на биофилми от патогенни или нежелани бактерии. Поради защитните механизми на образуваните биофилми (външните бактериални слоеве, емитираните в средата екзополisahариди, гликопротеини), отстраняването на биофилмите и превенцията спрямо биофилм-образуването не е лека задача. През последните години се посвещават изследователски усилия към изследване на механизмите на ко-агрегация с патогенни бактерии от страна на специално подбрани щамове, включително с пробиотичен потенциал. Това доказва, че изследванията в дисертационния труд са посветени на важен и актуален въпрос с приложно и икономическо значение.

Дисертационният труд е написан според класическата схема и съдържа Увод, Литературен обзор, Цел и задачи, Материали и методи, Резултати и Дискусия, Изводи, Приноси и Литература. Той е написан на 166 страници и съдържа 45 таблици и 68 фигури. Библиографията съдържа над 500 литературни източника, като голяма част от тях са след 2010 година.

В Литературния обзор е направен общ преглед на същността на процесите на образуване на биофилми, ролята и значението на биофилмите в природата и практиката. Разгледани са етапите на процеса на образуване на биофилми и влиянието на редица фактори от средата. В обзора се съдържа описание на същността на процеса на ко-агрегация, влияние на фактори върху ко-агрегационните взаимодействия и влияние на ко-агрегацията върху структурата на биофилмите от смесени микробни съобщества. Отделено е внимание на важността на ко-агрегацията и биофилм-образуването в устната кухина, интестиналния тракт и в други екосистеми. Описано е здравословното, екологичното и технологичното значение на процесите на ко-агрегация и биофилм-образуване. Постепенно в литературния обзор се разглеждат механизмите на ко-агрегация и образуване на биофилми като се детайлизират молекулите, обуславящи ко-агрегацията – адхезини и рецептори. Разгледани са регулаторните пътища при процесите на образуване на биофилми като се достига до конкретните процеси при щамове *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli*. Описани са структурни и регулаторни гени, свързани с ко-агрегацията и биофилм-образуването, върху експресията на които са провеждани изследвания през последните години. В обзора е отделено внимание и върху междуклетъчните комуникации в структурата на биофилмите и по-специално между щамове *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli*. Разгледана е ролята на кворум-сенсинг системата и на автоиндуциращи молекули от различни типове. Детайлно внимание е отделено на структурните компоненти на биофилмите: екзополисахариди, протеини, глико-протеини, извънклетъчни ДНК, както и на структурата на пилите, обуславящи адхезионните характеристики на бактериите. В обзора е направен обстоен преглед на факторите на околната среда, влияещи върху образуването на биофилми: състава на хранителната среда, включително глюкозната концентрация, азотните източници, рН, осмотичния потенциал; кислорода; температурата. В литературния обзор е обърнато специално внимание върху важни за практиката проблеми, свързани

с биофилм-образуването като резистентността на микробните биофилми, дисперсия на биофилмите от смесени микробни съобщества, разграждане на матрикса на биофилмите, третиране с антиадхезивни съединения, приложение на наночастици, бактериофаги, и др. В обзора е включен преглед на влиянията на щамове с пробиотичен потенциал от род *Lactobacillus* върху процесите на образуване на биофилми като са засегнати процесите на ко-агрегация пробиотик-патоген, конкурентното инхибиране на адхезията, влияние на извънклетъчни метаболити на млечнокиселите бактерии. Литературният обзор обхваща 55 страници от дисертационния труд и е написан задълбочено, целенасочено, с разбиране.

В раздела „Цел и задачи“ точно и ясно са формулирани основната цел и конкретните задачи, по които е работено в дисертационния труд. Целта е Да се изследват взаимоотношенията между щамове *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli* в процесите на ко-агрегация и образуване на смесени биофилми. Поставените задачи следват логически ход: изследване влиянието на фактори на средата върху индекса на ко-агрегация на подбрани щамове *Bacillus subtilis* с щамове *Escherichia coli* K-12; определяне влиянието на инхибитори върху ко-агрегацията; изследване влиянието на факторите на околната среда върху образуването на смесени биофилми; влияние на конкретни метаболитни продукти върху биофилм-образуването; изследване влиянието на метаболити на подбрани щамове млечнокисели бактерии с пробиотичен потенциал върху образуването на смесени биофилми; проверка на хипотезата за корелация между способността на двойките щамове за ко-агрегация и способността към образуване на смесени биофилми.

В раздела „Материали и методи“ подробно и с разбиране са описани използваните в дисертацията експериментални методи. Методичните подходи са основно:

- определяне индекса на ко-агрегация и влиянието на различни фактори върху него;
- конфокално лазерно сканираща микроскопия на агрегати и биофилми на щамове *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli* K-12;
- методи за определяне влиянието на различни фактори върху образуването на биофилми – въглехидратни и азотни източници, температура,

pH, осмотичния потенциал, фери йони, секретирани от щамове *Bacillus subtilis* протеази и метаболити, безклетъчни супернатанти на щамове *Lactobacillus*;
- статистическа обработка на резултатите.

Експериментите, представени в раздела „Резултати и дискусия“, могат да се обобщят по следния начин. Първото направление, в което докторантът работи е проучване на ко-агрегацията между щамове *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli* K-12 и влиянието на редица фактори върху нея.

Като второ направление може да се очертае изследване процесите на образуване на биофилми при щамове *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli* K-12. При съвместно култивиране на двата щам се достига до значително нарастване на биомасата на образуваните биофилми, в сравнение с биофилмите от единични щамове. Определено е влиянието на 5 въглехидратни източника върху интензитета на биофилм-образуването с извършен анализ на влиянието на конкретните захари относно образуването на биофилми. В изследванията е използвана и конфокално лазерно сканираща микроскопия за определяне на интензитета на биофилм-образуването в зависимост от: въглехидратните източници на средата, азотни източници, pH, температура, осмотичен потенциал, съдържание на фери-йони и др.

Третото направление е насочено към проучване механизмите на дисперсия на биофилмите под влияние на различни фактори: секретирана извънклетъчна протеаза от щамове *Bacillus subtilis*, концентрация на D-аланин, инхибиращи компоненти от супернатанти на щам *Escherichia coli* K-12, вещества с анти-адхезивни свойства (биосърфактанти, в случая). И в тези проучвания използването на конфокално лазерно сканираща микроскопия е важен изследователски прием за доказване влиянието на различни фактори върху биофилм-образуването. В това направление бих включил изследване влиянието на метаболитни продукти на щамове *Lactobacillus* върху дисперсията на биофилми. Доказана е анти-биофилмобразуваща активност на супернатанти на подбрани щамове *L. plantarum* и *L. bulgaricus*, като е определено влиянието върху числеността както на щамовете *B. subtilis*, така и на щам *E. coli* K12. Потискането на биофилмобразуването може да се дължи на различни компоненти от супернатантите: млечна киселина, бактериоцини, анти-микробни пептиди и др. За някои щамове *L. plantarum* е регистрирана

значителна редукция на числеността на двата щамове, изграждащи смесените биофилми.

Като цяло, разделът „Резултати и дискусия“ е написан компетентно и е документиран много добре. Докторантът анализира и дискутира задълбочено получените резултати.

Изводите обобщават правилно експерименталния материал, включен в дисертационния труд.

Представеният Автореферат отразява достоверно съдържанието на дисертационния труд.

Представени са 3 научни публикации, свързани с работата върху дисертационния труд, една от които с импакт фактор.

Докторантът има 13 доклада на научни симпозиуми.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

Дисертационният труд на Иво Ганчев е посветен на важен проблем, а именно: изследване механизмите на ко-агрегация и образуване на смесени биофилми от щамове *Bacillus subtilis* с щам *Escherichia coli*; влиянието на редица фактори върху тези процеси; дисперсия на биофилмите и влияние на подбрани щамове с пробиотичен потенциал върху биофилм-образуването. От представените резултати се вижда, че е извършена значителна по обем работа на добро ниво. Дисертационният труд разкрива автора си като един квалифициран микробиолог и аз препоръчвам присъждане на образователната и научна степен "Доктор" на Иво Ганчев.

28.06.2019г.

Жечко Димитров