

## **Рецензия**

От: **проф. Искра Витанова Иванова, дбн,**

Относно: оценка на дисертационен труд за придобиване на образователна и научна степен “доктор” в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление, 4.3 Биологически науки, докторска програма Микробиология

Автор на дисертационния труд: **Лили ИвайловаДобрева**

Заглавие на дисертационния труд: „Функционални характеристики на български щамове млечно кисели бактерии от различни хабитати

Научен ръководител: проф. Светла Данова, дн

### **1. АКТУАЛНОСТ И ЗНАЧИМОСТ НА РАЗРАБОТВАНИЯ ПРОБЛЕМ**

Микробиотата е един от решаващите фактори, които благоприятстват човешкия метаболизъм и здравословното му състояние и са обект на многобройни изследвания през последните години. Разработването на молекулярни техники сега позволява пълното идентифициране на отделните микроорганизми в сложните съобщества на различни ниши. както и във връзка в контекста на здравния статус на човека. Развитието на пребиотиците като хранителни добавки в търсене на максимален ефект върху поддържане баланса на чревната микробиота на човека, предизвиква засилен научен интерес. Пребиотиците са несмилаеми хранителни съставки, които селективно стимулират растежа, състава и активността на чревната микрофлора и по този начин подобряват здравето и благосъстоянието на гостоприемника.. Редица научни изследвания докладват за положителните ефекти на пребиотиците при борбата с физиологичните нарушения, предизвикани от окислителния стрес. Основният механизъм на действие на пребиотиците е свързан с растежа и развитието на полезната микрофлора в ГИТ на гостоприемника и получаване на късоверижни мастни киселини.

Всичко това ми дава основание да оценя като актуална представената научна разработка, с потенциал за научни постижения, които да имат бърза практическа реализация.

### **2. ОБЕМ И СТРУКТУРА НА ДИСЕРТАЦИЯТА**

Дисертацията е изложена на стандартни страници текст. Спазена е общоприетата схема и препоръчителните съотношения между отделните части на труда, както следва: *Въведение* – 1 стр.; *Литературен обзор* – 30 стр.; *Цел и задачи* – 1 стр.; *Материали и методи* – 17 стр.; *Резултати и обсъждане* – 90 стр.; *Изводи* 1 стр. и *Литература* – 35 стр. Получените резултати са илюстрирани с фигури и таблици и са представени 417 литературни източника.

### **3. ЛИТЕРАТУРНА ОСВЕДОМЕНОСТ И ПОСТАНОВКА НА ЦЕЛТА И ЗАДАЧИТЕ**

Настоящата дисертация е комплексна и предполага добро познаване на литературните източници и методите за решаването ѝ. Докторантката е направила обстоен преглед на постиженията на други изследователи, които е успяла да предаде и анализира върху 30 страници в литературния обзор. Обзорът представя детайлно състоянието на проблема и доказва необходимостта от разработването на дисертационната теза. Литературният обзор се състои от пет раздела: Включващи обща характеристика на млечно кисели бактерии (МКБ), представители и значение. Разгледани са лактобацилите в семейството на МКБ, тяхната обща характеристика и предложените неотдавна таксономични промени и рекласификация на род *Lactobacillus*. Описани са и местообитанието на млечнокиселите бактерии и лактобацили. Подробно са разгледани специфичността на молекулярно генетични методи за идентификация на лактобацили. Интерес представлява разглеждането на лактобацили като пробиотици и техните функционални характеристики. В четвъртата глава са описани *in vitro* критериите за безопасност на ЕФСА. Авторката разглежда и лактобацилите като технологично значими микроорганизми.

.На вниманието на читателя се предлагат и някои нерешени проблеми. Литературният обзор е конкретен, структуриран е правилно, следвайки логическата обвързаност на информацията. Данните от справка са послужили за ясното и правилно определяне не само на целта, но и за формулировката на задачите. Поставени са за решаване добре обосновани 9 експериментални задачи.

Литературата (както в обзора, така и в целия труд) е тясно свързана с темата на дисертационния труд. Литературният списък включва внушителния брой от 417 заглавия на латиница. Те са основно от последните години. Това говори за отлична теоретична осведоменост на докторантката и с цел намиране на ново научно предизвикателство.

### **4. ОЦЕНКА НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ МЕТОДИ И МАТЕРИАЛИ**

Разделът "Материали и методи" демонстрира набор от методи, съобразени с конкретните изисквания на експериментите. Те са съвременни и адекватни за реализацията

на дисертационния труд. Описани са точно и подробно, като изцяло покриват многостранните области на работата: от класическите до модерните изследвания

В отделните етапи на работата докторантката съчетава умело използваните подходи. Всички това ми позволява да дам висока оценка на научното ниво и на отличната подготовка на Лили Добрева, която успява правилно да съчетае многообразие от класически със съвременни методи за целите на дисертацията, успешно решавайки поставените експериментални задачи.

## 5. ОЦЕНКА НА ПОЛУЧЕНИТЕ РЕЗУЛТАТИ

Целта на настоящия дисертационен труд е оценка на функционалните характеристики на лактобацили от различни екологични ниши, като основа за разработване на функционални и естествено защитени храни; и пробиотични добавки с полезни за здравето на консуматора ефекти. За постигането на тази цел са формулирани девет експериментални задачи:

Раздел „*Резултати и обсъждане*“ е добре структуриран, подкрепен с табличен и графичен материал, с подходяща интерпретация на получени резултати от чужди научни колективи. Авторката последователно представя доказателствен материал по своята научна теза, като по този начин логически финализира експериментална работа. Извършена е голяма по обем и разнообразна експериментална работа в рамките на комплексно микробиологично и молекулярно генетично изследване. В настоящето изследване е охарактеризирана автохтонната млечно-кисела микробиота на различни местообитания. За целите на дисертацията са подбрани проби с животински, растителен и човешки произход. Стремещт е да се изолират МКБ от традиционни ферментирани български домашно приготвени продукти (катък, зелено сирене, кисело мляко) приготвени без използване на индустриални закваски ; от растителен произход (зелев сок, соеви зърна). Освен животински и растителни проби, са включени и изолати с човешки произход - вагинални проби от здрави български жени в репродуктивна възраст, както и проби от кърма на активно кърмещи жени, част от лабораторната колекция. Част от новоизолираните щамове са идентифицирани чрез генетични методи: Мултиплекс PCR и секвениране на части от рибозомалния оперон - 16S rPHK ген. За изолатите от катък е направен допълнителен външен анализ с Maldi-TOF MS (лазерно-индуцирана класификация на базата на протеомни отпечатьци). Изолирани са 57 нови щамове представители на сем. *Lactobacilacea* като основа за охарактеризиране на автохтонната млечно кисела микробиота на слабо проучени местообитания ( катък и зелено сирене, соя и майчина кърма). Видът *L. plantarum* е стабилно представен в смесените микробни ценози, резултат от естествената млечно-кисела ферментация на катък и зряло

зелено сирене и се доказва в проби от домашно кисело мляко и майчина кърма. Метагеномните анализи на уникалния български продукт зелено сирене от с.Черни вит доказват наличието на стабилен консорциум от млечно кисели бактерии на българското кисело мляко и комбинация от различни представители на клас *Ascomycota* и и доминиране на клас *Eurotiomycetes* – 88% гъби. *Lactiplantibacillus plantarum* щамове от катък и тези с растителен и човешки произход проявяват щамово специфичен широк спектър на антимикробна активност срещу Грам (+) и Грам (-) и са подходящи за разработване на биопротективни и пробиотични добавки. Спектърът на анти-микробната активност на лактобацили не е свързана с техния произход и продукцията на активни постметаболити зависи от условията на култивиране и кворума на щам- продуцент. В изследванията е отделено внимание на представителите на вида *Lactobacillus plantarum*. Всичките 26 тествани щам бяха отнесени към новия род *Lactiplantibacillus* и запазиха името на вида *plantarum*. Произходът им е предимно млечен - 24 изолата от млечни продукти (катак- 14, зелено сирене - 2, кисело мляко - 4 и бяло саламурено сирене - 4) и 2 от човешка кърма. Не е открита зависимост между произхода и активността на щамовете *L. plantarum*. Антагонистичната активност се дължи на ефекта на органични киселини и/или бактериоцини/BLIS. В условията на симулиран ин витро пасаж през различните отдели на ГИТ, лактобацилите от млечни продукти, с растителен и човешки произход щамове имат специфична транзитна толерантност, запазвайки жизненост и антимикробна активност. Подбраните активни *L. plantarum* щамове се характеризират с щамово -специфичен спектър на антибиотична чувствителност, без опасност за хоризонтален трансфер на гени за резистентност към определените по ЕФСА антибиотици. Постбиотиците и продуциращите живи култури от новоохарактеризираните лактобацили от катък нямат цитотоксичен ефект към HT-29, като модел на чревен епител, но повлияват щамово-специфично различни ракови линии. Сред новоохарактеризираните лактобацили от катък е избран кандидат пробиотичен щам *L. plantarum* ЛЗ с висока транзитна толерантност, способен да продуцира КВМК регулиращи чревния хомеостаз и невротрансмитери (GABA) с потенциал за ключови физиологични процеси. Мобилността на някои бактерии играе важна роля, като определящ фактор за вирулентност. За целта на дисертацията е оценена способността на лактобацили от катък да повлияват различни типове подвижност на щам *P. aeruginosa* PAO1. Проведени тестове показват способност на кисели супернатанти на 48ч. култури да инхибират временно способността на *P. aeruginosa* PAO 1 за трите типове подвижност. В тази връзка наблюдаваната активност на щамовете от катък ги определя като перспективни за охарактеризирани кандидат-пробиотици допълнително. Ефикасен начин за оценка кворум-сенсинг (QS) инхибиране на факторите на вирулентност е използван от авторката на

разработката. Слабо е проучен механизъм експресирани от МКБ, но с потенциал да бъде ефективен срещу патогените микроорганизми при участие на продуцираните активни метаболити / МКБ култури в ограничаване на патогения фенотип при моделен щам *Chromobacterium violaceum* 30191 DSMZ. Оценени са 44 щамове. Проведени са тестове *In vitro* за характеризиране спектъра на антигъбична активност при подбрани лактобацили срещу *Aspergillus niger* spp., *Fusarium oxysporum* spp., *Alternaria alternata* spp. Идентифицираните като *L. plantarum* изолати от катък (L1-L14) проявяват най-добър ефект срещу тест-мицетата *Alternaria alternata* инхибиране 90-100%), четири щамове (L9, L10, L11, L12) инхибират във висока степен (76-100%). Оценена е транзитна толерантност на МКБ в динамичен модел на последователно преминаване през условията на различните отдели на ГИТ *in vitro*. Висока транзитна толерантност е установена както за щамове катък, така и *L. gasseri* VC1 с човешки произход. Биофилмите на лактобацили в гастроинтестиналния и урогениталният тракт имат протективна роля. Характеризирани са биофилми от лактобацили в формиране в моделни системи като основа на пробиотични ефекти. В разработката е проведено определяне на способността да усвояват на пребиотици от изследваните щамове в моделни системи *in vitro*. Получените резултати са класифицирани в три групи според степента на тяхното използване – пълно, частично и неусвояване на изследваните олигозахариди. Резултатите с щамове от катък показват пълно използване от всички щамове на фруктоолигозахариди, и галактолигозахариди до 24тия час. Наблюдавано е частично усвояване на глюкоолигозахариди на 48-ия час за всички изолати. Единадесет от щамовете напълно метаболизират рафиноза до 48-ия час. Лактобацилни култури и техните безклетъчни филтрувани супернатанти (кБФС), са използвани по 2 метода за *in vitro* оценка на антиоксидантна активност- DPPH и ABTS. Щамовете от катък и млечни продукти, както и тези с човешки произход проявяват радикал-улавяща активност по-добре изразена при живи клетки, което в *in vivo* условия ще способства за намаляване негативните последствия за живата клетка в следствие оксидативния стрес. Тестът за чувствителност към антибиотици е основно изискване за оценка на безопасността на всеки пробиотичен щам. Значителни разлики в групата от 14 лактобацили се наблюдават по отношение на антибиотиците – инхибитори на протеиновия синтез. Голям брой резистентни щамове са показани за кларитромицин и аминогликозид-гентамицин. Установено е, че между 70% - 92% от изследваните щамове са чувствителни към доксициклин, кларитромицин, еритромицин и хлорамфеникол. Установено е, че тестваните щамове са резистентни и към цефалоспоринови III поколение – цефотаксим; цефтриаксон, цефтазидим. Установена е висока резистентност >70% към тетрациклин и гентамицин при тестваните щамове. Установява се висока резистентност >70% към тетрациклин и гентамицин при тестваните щамове. Също така е

проучена цитотоксичността спрямо еукариотни клетъчни линии ( в норма и патология) В резултат на проведените анализи можем изпитваните лактобацили с млечен и друг произход имат също щамово-специфичен слаб до умерен цитотоксичен ефект. *In vitro* и *in situ* е проведено охарактеризиране на технологично значими хакаактеристики при подбрани активни лактобацили, като основа за разработване на пробиотични добавки.

Получените резултати представени в „*Резултати и обсъждане*”, логично следват хода на решаването на поставените задачи. Те са обобщени и дискутирани в светлината на публикуваните данни от последните години. Висока оценка заслужават както идеята, така и обемът от изследвания проведен по изпълнението на тази задача и в целия труд. Направената дискусия по всеки експеримент, съпоставката на резултатите за отделните щамове и експерименти, и съпоставката с литературните данни, още веднъж подчертава качествата на докторантката във владенето на експерименталната теория. С това тя доказва, че е овладяла напълно третата степен на обучението си и е завършен експериментатор.

## **6. ПРИНОСИ И ЗНАЧИМОСТ НА РАЗРАБОТКАТА ЗА НАУКАТА И ПРАКТИКАТА, ЗАБЕЛЕЖКИ И ВЪПРОСИ**

Приемам направените приноси.

За особено значими считам, че за първи път са представени данни, за изолирани и идентифицирани лактобацили от род *Lactiplantibacillus* от проба зелено сирене от с. Черни вит и са потвърдени метагеномните данни за наличие на вида *Lactiplantibacillus plantarum* Характеризиран е посредством метагеномен анализ микробния консорциум на зелено сирене от с. Черни вит и е доказано стабилно доминиране на млечно-киселата микробиота в комбинация с fungi отговорни за уникалните качества на този млечен продукт.

Лили Добрева е автор в 3 научни публикации, като е водещ изследовател и 20 участия в научни форуми, което показва творческата и изследователската активност при изработването и оформянето им .

- **Lili Dobрева**, Kantcho Dragnev, Emiliya Mladenova, Svetla Danova (2019). Soymilk and Lactic Acid Fermentation- review. Acta Microbiologica Bulgarica.Vol.35 (1), 2019, p9-14, ISSN 0204-8809
- **L. Dobрева**, M.Koprinarova, A. Bratchkova, S.Danova (2020). Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus Plantarum* strains,isolated from katak. Bulgarian Journal of Veterinary Medicine, ISSN 1311-1477; DOI: 10.15547/bjvm.2020-0072. **Impact rang Q3**
- **L. Dobрева**, S. Danova, V.Georgieva, S. Georgieva & M. Koprinarova (2020). Anti-*Salmonella* activity of lactobacilli from different habitats. Bulgarian Journal of Veterinary Medicine, ISSN 1311-1477; DOI: 10.15547/bjvm.2395. , **Impact rang Q3**

Към дисертанта имам няколко забележки и въпроси:

- Дисертантката се е съобразила с всички направени забележки на проведената предзащита.
- Какви метаболитни пътища се използват от млечно киселите бактерии при усвояването на пробиотиците?

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Темата е актуална, докторантката е усвоила съвременни методи, експериментите са поставени методично правилно, получените резултати са достоверни и са солидна база за следващи научни и приложни разработки. Открояват се изключително оригинални научни и приложни приноси. Въз основа на гореизложеното уверено мога да заявя, че рецензираният дисертационен труд представлява оригинална научна разработка, с теоретично и приложно значение. Въз основа на събраните кредити е изпълнена успешно предвидената образователна научна програма. Предложената дисертация е доказателство, че Лили Добрева е развила компетентности необходими за присъждане на образователната степен доктор включващи теоретична подготовка, методологични познания, самостоятелност и опит за планиране на експерименти и способност за анализ на резултатите.

Въз основа на приведените аргументи за актуалност на проблематиката и оригиналните приноси, отразени в дисертационния труд давам своята висока оценка за неговата защита и препоръчвам на членовете на научното жури да присъдят на дисертантката Лили Добрева образователната и научна степен „Доктор” по професионално направление 4.3. Биологически науки, специалност Микробиология.

14.12.2022

:Подпис: