

## **С Т А Н О В И Щ Е**

**от проф. Мария Богомилова Ангелова, д.б.н.,** Институт по микробиология, „Стефан Ангелов” при БАН

върху дисертационен труд, представен пред научно жури, сформирано със заповед № I-139 от 03.11.2022 г на Директора на Институт по микробиология „Стефан Ангелов“ при БАН

за получаване на образователната и научна степен “доктор” в Професионално направление: 4.3. Биологични науки, Докторска програма: Микробиология

Автор: **Лили Ивайлова Добрева**

Тема: **ФУНКЦИОНАЛНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА БЪЛГАРСКИ ЩАМОВЕ МЛЕЧНОКИСЕЛИ БАКТЕРИИ ОТ РАЗЛИЧНИ ХАБИТАТИ**

Научен ръководител: **проф. Светла Данова, дбн**

### **Актуалност на тематиката**

Ползата от млечнокиселите бактерии (МКБ) за човека има дълга история, началото на която датира от древните времена. В днешни дни, нуждата от безопасни и полезни за здравето храни на основата на МКБ непрекъснато нараства. Според „Евромонитор“ световния пазар за този род функционални храни се оценява на 177.4 млрд \$ за 2021 г., като се очаква през 2026 г да достигне 219.6 млрд \$, т.е. годишно увеличение на продажбите с около 4.5%. Тук трябва да се добавят про-, пре- и постбиотиците. Това налага по-голям мащаб на изследванията за изолиране и характеризирание на нови щамове МКБ, за да се отговори на потребителското търсене. Разработването на ефективни щамове е ключов сценарий и в индустрията. Именно това е научната насоченост в разработката на Лили Добрева, което е указание за нейната актуалност и значимост. Дисертационната теза е фокусирана върху повишаване на знанията и възможностите за приложение на български щамове МКБ. Новото тук е търсенето на неизползвани досега източници за изолирането им и тяхната детайлна характеристика, което създава предпоставки за оригинални приноси.

### **Познаване на проблема**

Дисертационният труд е конструиран в традиционна форма със съответните раздели. Написан е на 194 стандартни компютърни страници, които включват 148 страници текст, 34 страници литература и 12 страници приложения. Литературният обзор е изготвен целенасочено и конкретно и отчита всички аспекти на изследването. В него са отразени 478 литературни източника, от които 476 на латиница, кореспондиращи с всяка една от поставените задачи. Обзорът представя състоянието на проблема в момента, като коректно отчита постигнатото до този момент при изолирането и предлагането на нови щамове,

последните новости в таксономията и ре-класификацията на род *Lactobacillus*, охарактеризирането им като пробиотици и включването им във функционални храни с всички задължителни за това доказателства за безопасност и ефективност. Материалът е представен ясно, четете се с лекота и интерес, за което допринасят включените таблици и фигури.

Въз основа на анализа в литературния обзор е изведена целта на настоящата дисертация. Тя е ясна, добре формулирана и обединява всички направления на експерименталната работа. За реализиране на тази цел са формулирани 9 конкретни, взаимно обвързани и логически следващи задачи. Според мен, те включват всички задължителни етапи на подобно проучване.

### **Методика на изследването**

Разделът „Материали и методи“ отговаря на актуалния характер на разработката, използвани са рутинни и съвременни микробиологични, биохимични и молекулярно-генетични методи. Всички те са адекватни на изследванията и създават предпоставка за коректни резултати. Тук искам да отбележа методите на метагеномния анализ, мултиплекс PCR амплификация, оценката за пробиотичната функционалност и критериите на ЕСФА, биофилм-образуващата и антиоксидантната активност, кворум-сенсинг, антибиотична чувствителност и др. Освен това, методите са представени разбираемо и достатъчно пълно, за да бъдат възпроизведени. Този раздел включва много добре оформени таблици и схеми, които внасят яснота в изложението.

### **Характеристика и оценка на дисертационния труд и приносите**

В раздел „Резултати и обсъждане“ е отразен голям по обем експериментален материал, представящ едно логически свързано и напълно завършено изследване в съответствие с поставената цел. Работата започва с изолиране на МКБ от различни местообитания (млечни продукти, растителни проби и човешка кърма) и тяхното морфологично, физиологично и биохимично характеризирание. Следват PCR анализи и видова идентификация на новоизолирани МКБ, съобразена с новата таксономична класификация на род *Lactobacillus* от 2020 г. Чрез мултиплекс PCR и MaldiToF-TOF MS докторантката доказва наличието на представители на новия род *Lactiplantibacillus*. Много сериозно впечатление прави и проведеното метагеномно проучване на проби от зелено сирене от района на Черни Вит. Подобни изследвания са изключително трудоемки и рядко срещани в България. Данните доказват наличието на родове, типични за млечно-кисела ферментация, но така също и на родовете *Leuconostoc*, *Lactococcus* и *Pediococcus*, които са отговорни за антимикробно действие и допринасят за аромата. С този анализ е установено и присъствието на някои патогенни видове от род *Staphylococcus* и гъби от отдел *Ascomycota*.

В логическа последователност следват експерименти за антимикробна активност на подбрани щамове срещу *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, хранителни патогени

(*E. coli* 420) и клиничен щам *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Трябва да се подчертаят детайлните проучвания относно антигъбичната активност, преживяемостта при различно рН, транзитна толерантност в условията на гастроинтестинален трак, способността за образуване на биофилми, доказващи пробиотичния потенциал на новоизолираните лактобацили. В тази връзка са получени и данни за усвояването на пребиотиците – проучваните щамове усвояват фруктоолигозахариди и галактоолигозахариди, частично глюкоолигозахариди, а единадесет от тях напълно метаболизират рафиноза.

В съответствие с много актуалните понастоящем търсения на природни антиоксиданти, в дисертацията са представени резултати за изявената радикал обезвреждаща способност на живи клетки и метаболити от тях. Този раздел очертава предпоставка за създаването на нови биоантиоксиданти и функционални храни.

Като задължително изследване за охарактеризиране на новоизолираните кандидат-пробиотици, докторантката проверява тяхната безопасност съгласно критериите на ЕФСА – антибиотична чувствителност спрямо широко използвани антибиотици, с различен механизъм на действие, както и цитотоксичност спрямо еукариотни клетъчни линии. Установени са щамове, резистентни към пеницилин, пиперацилин, цефалоспорини III поколение и ванкомицин и такива, които повишават преживяемостта на различни ракови линии. Представени са подобрени активни лактобацили с технологично значими характеристики като основа за разработване на пробиотични добавки - растеж и биофилм-формиране в различни хранителни среди, коагулационна, протеолитична и казеинолитична активност и съвместимост със закваски за българско кисело мляко.

Дисертационната разработка завършва с метаболомен анализ на щам *L. plantarum* 3 (от катък), който показва широк набор от полярни метаболити и органични киселини. Интерес представлява установената повишена концентрация на 4-гама-аминобутирова киселина (GABA), която е отговорна за множество физиологични функции на клетката.

В този раздел, едновременно с коректното отразяване на получените данни, е представена и убедителна дискусия на базата на литературата от последните години, а това е указание за доброто познаване на проблема.

Изводите съответстват на получените резултати и подчертават мащаба на изследванията и тяхната приложна значимост. Приемам представените от докторантката приноси. Според мен, най-значимите се състоят в следното:

1. Създадена е сбирка от 51 нови и идентифицирани представители на сем. *Lactobacillaceae*, изолирани от автохтонната млечно кисела микробиота на слабо проучени местообитания.
2. Чрез метагеномен анализ е направена характеристика на микробния консорциум на зелено сирене от с. Черни Вит.

3. За първи път са изолирани и идентифицирани лактобацили от род *Lactiplantibacillus* от проба зелено сирене от с. Черни Вит и е потвърдено наличието на вида *Lactiplantibacillus plantarum* в продукта.
4. Доказано е, че традиционните млечни продукти от изследваните местообитания са обещаващ източник на нови кандидат-пробиотични култури.
5. Селектирани са щамове с функционални характеристики, подходящи за използване като добавки срещу микроорганизми, развалящи храните и патогени.

Към достоинства на дисертацията на Лили Добрева отнасям още добрия научен стил и отличното оформление, коректното отразяване на резултатите в 22 таблици и 48 фигури, като и тяхното професионално представяне.

### **Преценка на публикациите и личния принос на докторанта**

Получените резултати са включени в 3 журнални статии, двете от тях е в списание с импакт ранг и квантил Q3. Освен това, Лили Добрева е участвала в 18 научни форуми, като в 7 от тях с доклади. Във всички статии и в 8 участия докторантката е на първо място, което доказва нейният значим дял в разработването на дисертационния труд.

### **Заклучение**

В заключение искам да подчертая, че докторантката е изпълнила изискванията на ЗРАСРБ, като и тези в Правилника на ИМикБ за придобиване на образователната и научна степен ”доктор”. Освен това, материалът, който представя Лили Добрева е дисертабилен, темата е актуална и предлага съвременно ниво на важен за теорията и практиката въпрос. В процеса на обучение тя е усвоила широк набор от модерни методи, а така също умението да интерпретира данни, да търси и критично да оценява подобни изследвания в литературата и да формулира обяснения. Според мен, получените резултати са достоверни и са база за следващи научни и приложни разработки.

Въз основа на направения разбор и като имам предвид актуалността и нивото на работата, **убедено предлагам на уважаемите членове на Научното жури**, сформирано със заповед № I-139/03.11.2022 г на Директора на ИМикБ при БАН да **присъдят на Лили Ивайлова Добрева образователната и научна степен “доктор”** по професионално направление 4.3. Биологични науки, Докторска програма: Микробиология.

10 декември, 2022 г

София

.....  
/проф. Мария Ангелова, дбн/