

СТАНОВИЩЕ

от проф. д-р **Вяра Николаева Иванова-Пашкулова,**
катедра “Микробиология”,

Университет по хранителни технологии (УХТ) - Пловдив

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен 'доктор'
в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика
професионално направление 4.3. Биологически науки
научна специалност Микробиология

Автор: маг. инж. НИКОЛАЙ ТЕОДОРОВ КАРАПЕТКОВ

Тема: “ХАРАКТЕРИЗИРАНЕ, ЕФЕКТИВНОСТ И ПОНОСИМОСТ НА ПРОБИОТИЧНАТА ДОБАВКА ЛАКТИНА ПРИ ЖИВОТНИ ”

Научни ръководители: проф. д-р П. Мончева и проф. д-р С. Сурджийска

Със заповед № РД-38-124/09.02.2018 г на Ректора на Софийския Университет „Св. Климент Охридски“ съм определена за член на научното жури за осигуряване на процедура за защита на дисертационен труд на тема “**Характеризиране, ефективност и поносимост на пробиотичната добавка Лактина при животни**” за придобиване на образователната и научна степен ‘доктор’ в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3. Биологически науки, научна специалност **Микробиология**. Автор на дисертационния труд е **маг. инж. Николай Теодоров Карапетков** – докторант на самостоятелна подготовка към катедра „Обща и промишлена микробиология“ на Биологическия факултет на СУ „Св. Климент Охридски“ с научни ръководители **проф. д-р Пенка Ангелова Мончева** и **проф. д-р Събка Милкова Сурджийска**.

Представеният от **маг. инж. Николай Теодоров Карапетков** комплект материали на хартиен и електронен носител включва изискваните документи и материали, дисертация, автореферат. Докторантът е приложил 9 броя публикации, една е под печат. Представени са 4 постера, една лекция и един доклад. Той е водещ автор в 4 от публикациите, шест са в чуждестранни списания и книга и три са в български списания. Пет са реферирани в Scopus, четири са с импакт фактор.

Докторантът е магистър по Технология на храните (мляко и млечни продукти). Завършил е висше образование (магистърска степен) през 2008 г. в Техническия Университет, Берлин. От 2016 г. е докторант на самостоятелна подготовка към катедра „Обща и промишлена микробиология“ на Биологическия факултет на СУ „Св. Климент Охридски“ . От 2010 г. е на работа във фирма Лактина ООД. По време на следването си е бил сътрудник на фирмите „Francia Mozzarella“, Берлин и в Опитния институт по ферментационни технологии и производство на алкохол VLSF, Берлин.

Професионалните му интереси и умения са в областта на селекцията и култивирането на щамове млечнокиселии бактерии с пробиотичен характер; изследването на морфологични, физиологични и биохимични характеристики на микроорганизми; идентификационните методи за диференциране на различни видове микроорганизми (API тестове; PCR анализи); определянето на антимикробна активност, спектрофотометрия, денситометрия;

статистическите анализи. Има общо девет научни публикации и шест участия в научни форуми.

1. Актуалност и значимост на изследвания проблем

Дисертационният труд на маг. инж. Николай Теодоров Карапетков е посветен на характеристиката на пробиотик за животни, съдържащ специално култивирани полезни млечнокисели бактерии, които стимулират продуктивността на животните и техния оптимален здравен статус. Пробиотиците са живи микроорганизми, които влияят чрез положителна промяна на баланса между видовете микроорганизми в макроорганизма и по този начин въздействат върху здравето и продуктивността на животните. Пробиотикът укрепва имунната система, потиска гнилостните процеси в червата и спомага за възстановяване на чревната микрофлора, влияе благоприятно на перисталтиката и функционирането на червата, има изразена антимикробна активност. На тази база оценявам като актуална представената научна разработка.

2. Обем и структура на дисертационния труд

Дисертационният труд съдържа 157 страници заедно със списъка на използваната литература, 50 таблици и 48 фигури. В библиографската справка са включени 202 заглавия на латиница и 3 на кирилица. Резултатите и дискусиата към тях заемат 73 страници, 35 таблици и 44 фигури. Дисертацията е написана стегнато, а графичният материал е оформен добре. Съотношението между отделните части на дисертацията е спазено.

3. Литературна осведоменост, цел и задачи

Избраната за решаване задача е комплексна и предполага добро познаване на литературните източници и методите за решаването ѝ. Докторантът е направил обстоен преглед на постиженията на други изследователи, които е успял да предаде и анализира върху 27 страници в литературния обзор. Разгледани са функциите на пробиотичните добавки, колонизацията на гастроинтестиналния тракт, пробиотиците с приложение в животновъдството, ролята на млечнокиселите бактерии и други бацили, приложението на живи микроорганизми във фуражите, влиянието на пробиотиците върху продуктивността на животните, критериите за селекция на потенциално пробиотични щамове за приложение при животните. Литературната справка според мен е оптимална по обем предвид сложността на тематиката. Подкрепена е с 4 фигури и три таблици. Обзорът се чете лесно, написан е ясно и интелигентно. Литературните източници са правилно и коректно цитирани.

Данните от справката са послужили за ясното и правилно определяне на целите, задачите за решаване в дисертацията и избраните методи, а именно – целта на дисертационния труд е оценка на основните функционални характеристики на млечнокиселите бактерии, влизащи в състава на пробиотичната добавка Лактина и охарактеризиране на нейния биологичен ефект като добавка към комбинирани фуражи за животни.

Основните задачи включват: 1/ - характеристика на млечнокиселите бактерии, влизащи в състава на пробиотична добавка Лактина; 2/- изследване на *E. faecium* NBIMCC 8270 за наличие на вирулентни гени; 3/ - *In vitro* оценка на основните функционални характеристики на щамовете от пробиотичната добавка Лактина; 4/ - проверка на генетичната стабилност на щамовете, влизащи в добавката; 5/ - характеристика на биологичния ефект на пробиотик Лактина в условия *in vivo*.

4. Оценка на използваните методи и материали

Формулираните от дисертанта задачи предполагат владение на голям набор от съвременни микробиологични, биохимични, молекулярнобиологични и аналитични методи, което е видно и от раздела Материали и методи. Приложени са подходящи методи, които са надлежно описани. Те включват охарактеризиране на чисти микробни култури, съвременни генетични анализи и видова идентификация на изолираните щамове, анализ на *in vitro* транзитна толерантност на лиофилизирани култури в условия симулиращи гастроинтестинален тракт, антиминокробна активност, чувствителност на микроорганализмите от добавката към различни антибиотици, оценка на адхезионната способност на щамовете от пробиотичната добавка Лактина към НТ-29 клетъчна линия, генетична стабилност на щамовете чрез RAPD-PCR анализ, изследване на *E. faecium* NBIMCC 8270 за наличие на гени за вирулентност. Последното е извършено в сътрудничество с Института по експериментална медицина в Санкт Петербург, Русия.

Проведени са биологични опити с животни – зайци, пилета-бройлери. Изследвано е отделянето на Шига токсин продуциращ щам *E. coli* non-O157 STEC при овце.

Всичко тези методи повишават значително научното ниво на дисертационния труд на **маг. инж. Николай Теодоров Карапетков**.

Анализите са проведени със спазване на изискуемите повторения. Използвани са съвременни компютърни методи за доказване на достоверност на резултатите - Excel Office 2007, Програма ANOVA, еднофакторен анализ.

5. Оценка на получените резултати

В дисертационния труд е направена оценка на основните функционални характеристики на шест щам млекоиселите бактерии изолирани от домашно приготвени млечни продукти или плодове - *Lactobacillus acidophilus* NBIMCC 8242, *Lactobacillus helveticus* NBIMCC 8269, *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* NBIMCC 8250, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* NBIMCC 8244, *Streptococcus thermophilus* NBIMCC 8253 и *Enterococcus faecium* NBIMCC 8270, влизащи в състава на пробиотична добавка Лактина и охарактеризиране на нейния биологичен ефект като добавка към комбинирани фуражи за животни. Чистотата и идентичността на щамовете са определени на база на морфологични и физиолого-биохимични характеристики, ферментационен профил чрез системата API 50 CH и ензимен профил чрез APIZYM. На базата на тези анализи е потвърдена видовата принадлежност на всички щамове.

Изследван е генетичният профил на *E. faecium* NBIMCC 8270 по отношение на 9 гена, кодиращи основни фактори на патогенност при ентерококите, като е установено, че той е безопасен компонент на пробиотична добавка Лактина и годен за приложение при животни.

В условия *in vitro* е направена оценка на основните функционални характеристики на щамовете като транзитна толерантност в условия, симулиращи гастроинтестиналния тракт, адхезионна способност като механизъм за трайна колонизация в ГИТ, антиминокробна активност и чувствителност към антибиотици. Установено е, че щамовете, влизащи в състава на пробиотична добавка Лактина притежават добра *in vitro* устойчивост към условия, симулиращи гастроинтестиналния тракт, която е по-добра при *S. thermophilus* NBIMCC 8253 и *E. faecium* NBIMCC 8270 в сравнение с лактобацилите, което ги прави приложими като добавка към фуражи за животни. Щамовете се характеризират с умерена до висока

адхезираща способност, което е предпоставка те да колонизират епителните повърхности с възможност да станат част от постоянната микрофлора на гастроинтестиналния тракт.

Антибактериалната активност на щамовете се дължи главно на синтезираната от тях млечна киселина и само за три от щамовете и на вещества с друга химична природа.

Направена е характеристика на биологичното действие на пробиотичната добавка Лактина по отношение на редица показатели като живо тегло, дневен прираст, консумация и оползотворяване на фураж, разход на фураж за един кг прираст, индекс на продуктивност, здравословен статус и кланични показатели при два вида експериментални животни (зайци и пилета), приемали различни дози от добавен към фуража пробиотик. На базата на тези анализи е установена оптималната доза на пробиотика, осигуряваща най-висока ефективност на добавката.

Проведени са експерименти в условия *in vivo* с два вида опитни животни за установяване на поносимостта им към пробиотика, при неговото приемане в оптимална, десетократно и стократно по-висока доза. Не се установява неблагоприятно влияние върху изброените по-горе показатели, характеризиращи състоянието на третираните животни и ефективността от приема на добавката.

На базата на опити с овце, заразени с *E. coli* non-O157 STEC и получавали или не пробиотичната добавка е установено, че приемането на добавката от овцете има за резултат намаляване на отделянето на STEC с фекалиите.

6. Приноси и значимост на разработката за науката и практиката

Искам специално да отбележа направения от маг. инж. Николай Теодоров Карапетков коментар по всеки експеримент, съпоставката на резултатите за отделните щамове и експерименти, и съпоставката с литературните данни, което още веднъж подчертава качествата на докторанта и владенето на експерименталната теория. С това доказва, че е овладял напълно третата степен на обучението си.

Приносите на дисертацията имат научен и научно-приложен характер. Основен научен принос на изследването е, че за първи път е направена *in vitro* оценка на основни функционални характеристики (транзитна толерантност в условия, симулиращи гастроинтестинален тракт, адхезионна способност, антимикробна активност, чувствителност към антибиотици), както и оценка на генетичната стабилност на щамовете, влизащи в състава на пробиотична добавка Лактина при различни начини на съхранение. Доказано е, че *Enterococcus faecium* NBIMCC 8270 е чувствителен към клинично значими антибиотици и не съдържа маркерни гени, типични за щамове на вида, отговорни за предизвикването на вътреболнични инфекции. Допълнена е информацията за биологичния ефект на пробиотик Лактина в условия *in vivo* и за първи път се предоставя информация за поносимостта на различни дози от него при зайци и пилета. Доказан е потискащ ефект на пробиотик Лактина върху *E. coli* non-O157:H7 STEC при овце, което допълва спектъра на неговото биологично действие и приложение.

Имам някои забележки към дисертацията, които са несъществени на фона на получените резултати. Към текста на дисертацията не е приложен раздел Приноси, някои известни методики са описани прекалено посробоно, данните за цитируемостта е добре да бъдат приложени към автореферата. Нямам съществени забележки и препоръки към научните експерименти и дискусията по тях.

Представени са 9 броя публикации, една е под печат, но липсва документ, доказващ приемането на статията в редакцията. Този факт не е съществен предвид броя и качеството на останалите публикации. Представени са също 4 постера, една лекция и един доклад. В публикациите **маг. инж. Николай Теодоров Карапетков** е водещ автор в 4 от тях, шест са в чуждестранни списания и книга и три са в български списания. Пет са реферирани в Scopus, четири са с импакт фактор. Общият импакт фактор е 10.304. Открити са 29 цитата на три публикации. Считам, че публикациите отразяват резултатите от дисертационния труд и са дело основно на дисертанта.

Авторефератът е направен според изискванията на съответните правилници и отразява основните резултати, постигнати в дисертацията.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд на тема: **“Характеризиране, ефективност и поносимост на пробиотичната добавка Лактина при животни”** с автор докторанта на самостоятелна подготовка **маг. инж. Николай Теодоров Карапетков съдържа научни и научно-приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката и отговарят на всички изисквания** на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ) и на Правилника за прилагане на ЗРАСРБ. Представените материали и дисертационни резултати **напълно съответстват** на специфичните изисквания на Правилника на Биологическия факултет на СУ „Св. Климент Охридски“, приети във връзка със ЗРАСРБ и Правилника за приложение на ЗРАСРБ. Дисертационният труд показва, че докторантът **маг. инж. Николай Теодоров Карапетков притежава задълбочени теоретични знания и професионални умения** по научна специалност **Микробиология** като демонстрира качества и умения за самостоятелно провеждане на научно изследване.

Поради гореизложеното, убедено давам своята **положителна оценка** за проведеното изследване, представено от разгледаните по-горе дисертационен труд, автореферат, постигнатите резултати и приноси, и **предлагам на почитаемото научно жури да присъди образователната и научна степен ‘доктор’** на **маг. инж. Николай Теодоров Карапетков** в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3. Биологически науки, научна специалност **Микробиология**.

02.04.2018 г.

Изготвил становището:

проф. д-р Вяра Николаева Иванова-Пашкулова