

## РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд на тема:

### **ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПРОБИОТИЧНИЯ ПОТЕНЦИАЛ НА МЛЕЧНОКИСЕЛИ БАКТЕРИИ С РАЗЛИЧЕН ПРОИЗХОД**

Представен от **Йорданка Димитрова Дерменджиева** за присъждане на образователна и научна степен **“Доктор”** в област 4. „Природни науки, математика и информатика; професионално направление 4.3. „Биологически науки“ Докторантска програма: **“Микробиология“**  
С научен ръководител: **проф. д-р Петя Христова,**  
от **проф. д-р Светла Данова, дн.**

Институт по микробиология „Стефан Ангелов“, БАН

#### **ОТНОСНО ПРОЦЕДУРАТА:**

Настоящата процедура по придобиване на ОНС „Доктор“ се провежда на основание чл. 4 от ЗРАСРБ, във връзка с §7 от Преходните и заключителни разпоредби на Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в СУ „Св. Кл. Охридски“, Решение на Факултетния съвет на Биологически факултет (*Протокол № 2*) от 01.02.2022 г.. Съгласно Заповед (*№ РД 58-107/15.02.2022 г.*) на Ректора на Софийски Университет „Св. Климент Охридски“ съм избрана за член на Научно жури по горепосочения конкурс и съм определена за рецензент на първото му заседание. В качеството ми на рецензент, декларирам, че не съществува конфликт на интереси по смисъла на § 1, т. 2а от допълнителните разпоредби на ЗРАСРБ между мен и кандидата по процедурата за ОНС „Доктор“ и не са налице ограниченията по чл. 33 от ЗРАСРБ.

Доказано е по законоустановения ред отсъствие на плагиатство в научните трудове на кандидатката.

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

Представеният ми за рецензия дисертационен труд проучва различни аспекти от биологичната активност при български щамове млечно кисели бактерии (МКБ) с различен произход. Стремежът е да се постави основата за определяне на техния

пробиотичен потенциал и подбора на ефективни пробиотици, със значение за хомеостаза на човешкия микробиом.

Човешкото здраве винаги е било във фокуса на микробиологичните научни изследвания, но поради динамиката, нарастващия брой и вариабилност на болестотворните факторите, всяко ново проучване допринася за подобряване на подходите за терапия и профилактика. Докторантката правилно оценява ролята на микробиома и се насочва към изследване на полезни характеристики на група микроорганизми, които в последните години активно се изследват като ключов фактор в здравния хомеостаз. Проучването е *in vitro* и е предпоставка за развитие с практическа насоченост - създаване на действени пробиотици. Всичко това ми дава основание да подчертая актуалността и значимостта на разработката.

#### ОБЕМ И СТРУКТУРА НА ДИСЕРТАЦИЯТА

Дисертационният труд е написан по стандартната схема в обем от 210 стр., спазвайки правилника за приложение на ЗРАСРБ при БФ - СУ „Кл. Охридски“. Работата включва: *Увод* - 2 стр., *Литературен обзор* - 49 стр.; *Цел и задачи* - 2 стр.; *Материли и методи* - 30 стр., *Резултати и обсъждане* - 63 стр., *Изводи* - 3 стр., *Приноси* - 1 стр. *Използвана литература* - 19 стр.; *Приложения* - 23 стр., както и *Подробен лист-указател* на всички фигури и таблици.

Спазени са изискванията за форма, съдържание и съотношение на отделните раздели, независимо от големия за малка докторска обем. Прави впечатление точният научен стил и правилният граматическа издържан български език. Надлежно посочените съкращения, заедно с изведените в отделни списъци с таблици и фигури улесняват четенето и оценката на дисертационния труд.

Литературният обзор и последващият раздел „Резултати и обсъждане“ са в тясна логическа обвързаност. Материалът е богато илюстриран с 39 фигури и 53 таблици. Докторантката има предпочитание към табличната форма за обобщаване на резултатите. Потвърждавам мнението си, че част от обобщенията биха спечелили от графично представяне. То би дало по-точна картина на разликите между отчитаните показатели при пробите подложени на количествени микробиологични анализи, но приемам положително решението на авторката. Видно от обобщените данни тези анализи са направени в нужния брой повторения и докторантката е посочила стандартното отклонение при измерванията. Напр. даните обобщени в табл. 19, особено данните от табл. 35 - 40 по „*Изследване на качеството на крайните пробиотични*

*продукти*“ носят много интересна нова информация. Бих препоръчила тези оригинални резултати да бъдат оценени по отношение статистически достоверни разлики ( t-test или друг статистически метод) и да бъдат оформени в научна публикация за да стане достояние на широката научна общност. Това ще представлява допълнителен научен принос на цялата работа, поради факта, че много малко информация е налице по въпроса с финалната разработка на пробиотичен продукт. В търсене на иновативни решения тази част от труда е изпълнена в широк мащаб и има практическо значение.

#### ЛИТЕРАТУРНА ОСВЕДОМЕНОСТ И ПОСТАНОВКА НА ЦЕЛТА И ЗАДАЧИТЕ

Считам, че литературният обзор освен че е добре структуриран, е достатъчно изчерпателен. Подробно са разгледани:

(1) *Общата характеристика на млечнокиселите бактерии; тяхната класификация и разпространение;*

(2) *Човешкото тяло като местообитание на микроорганизми, – с акценти върху микробиологията на стомашно-чревеният тракт и влагалището като местообитание на млечнокисели бактерии и Кърмата като източник на млечнокисели бактерии;*

(3) *Приложение на млечнокиселите бактерии като пробиотици с акценти върху понятията за синбиотик, пробиотик, паробиотик, механизмите на пробиотично действие и кратка характеристика на продуцираните метаболити с анатагонистичен ефект, гарантиращи доминирането на МКБ в микробиома.*

В пряка връзка със задачите е и разделът представящ *„Характеристиките на млечнокисели бактерии, най-често влагани в пробиотични продукти“* и *„Етапите на разработване и внедряване на пробиотичен продукт“*. Това показва отлична теоретична осведоменост на докторантката. Цитираната литература от 209 източника (както в обзора, така и в целия труд) е актуална и тясно свързана с дисертационната тема. Много добро впечатление прави представянето на най-новите данни в областта на МКБ и познаването на промените в таксономията на род *Lactobacillus*. Добре онагледено с филогенетично дърво е семейството *Lactobacilaceae* и рекласифицирането на множество лактобацилни видове в 23 нови рода. Докторантката правилно е отразила новите таксономични наименования при видовото идентифициране на изолираните за целите на дисертацията щамове (Табл. 25 и 26). Фигурите взаимствани от литературни източници са правилно обозначени. Налице са и авторски адаптации по литературни данни. Много хубаво впечатление правят обобщителните таблици с информация за

характеристиките на различните представители на млечно киселите бактерии. В технически план препоръчвам докторантката винаги да спазва правилото за първо цитиране на латинските имена на микроорганизмите. Това са технически редакции, които касаят по-скоро представянето, а не същността на труда и в никакъв случай не намаляват достойнствата му.

Структурата на литературния обзор цялостно следва една много добра логическа последователност и води към целта на разработката: *„Да проведе комплексно изследване на биоразнообразието, таксономичния статус и пробиотичния потенциал на млечнокисели бактерии, изолирани от недобре проучени до момента в България човешки (майчинина кърма), растителен (спонтанно ферментирани зеленчукови храни) и животински (сурово-сушени меса) биотопи и да изследва факторите, повлияващи качеството и стабилността пробиотичните продукти.“*

За постигането и докторантката и нейната ръководителка са формулирали 4 основни задачи в панел от подробно разписани към тях 18 подзадачи. Интересен е подходът те да бъдат разделени в четири основни оси на изследване, което е тематично и дава цялостен облик на една логически свързана и добре обоснована разработка.

Прави отлично впечатление ясната и правилна формулировка на всички задачи.

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

Подбрани са богат набор от подходящи хранителни среди, условия и правилните методични подходи за изпълнението на различните задачи. Оптимизирани са някои от работните протоколи за прилагането на утвърдени микробиологични методи, с цел комплексна оценка на слабо-проучените специфни хабитати.

Използвани са класически микробиологични и биохимични подходи, които са добре научно обосновани в микробиологичната практика. Това е доказателство, за много и разнообразни методи, които Й. Дерменджиева е усвоила и успешно е приложила към обектите на изследване. Авторката избира класическата фенотипна характеристика и биохимичен профил, базиран на 29 субстрата – в кит BD BBL Crystal System, Anaerobe (която се препоръчва само за ограничен брой лактобацилни видове) и ги комбинира с тест с лакмусово мляко, с Индол тест DMACA Indole Reagent Droppers, без да счита че те самостоятелно са достатъчни за видова идентификация. Дори и в рамките на молекулярно генетичната характеристика, правилно се отчита ограниченията произлизащи от високото генетично сходство между част от предполагаемите видове МКБ и се търси разграничаване на изолатите на база

съчетаване на различни по своята дискриминативна способност подходи. Т.е. докторантката познава изискванията на съвременната полифазна таксономия. Умело комбинира доказани със своята дискриминативност молекулярно генетични методи, последователно надграждайки анализите от родово идентифициране чрез PCR амплификация на интергенни участъци от единична колония и ДНК; Multiplex PCR амплификация с групово-специфични праймери и PCR, с видово специфични праймери за *L. plantarum*. Препоръчвам да бъде проверена спецификата на използвания метод, който не разграничава трите близкородствени вида *Lacctiplanibacillus plantarum*, *L. pentosus* и *L. paraplantarum*.

Правилно са подбрани и описани методите за оценка на пробиотичния потенциал на група от 25 новоизолирани и идентифицирани МКБ. Отлично впечатление правят авторските схеми, илюстриращи работните протоколи, с които докторантката представя детайлите от етапите на работа и методичните подходи.

#### **ОЦЕНКА НА ПОЛУЧЕНИТЕ РЕЗУЛТАТИ**

Цялостно дисертационният труд е обемен, много сериозен и оценява важни аспекти от видовото разнообразие и пробиотичния потенциал на млечно кисели бактерии от слабо проучени местообитания. Комбинацията от хранителни среди и схемата за изолиране и видово охарактеризиране са правилни и много добре логически построени. Оригинален е начинът на еднозначно обозначаване на изолатите, показващо както произхода, така и елективната среда от която е изолиран. Така работата придобива пригледност и яснота с какви изолати от кое от местообитанията е работено.

Оценявам като амбициозна задачата да се изолират МКБ, не от една а от три слабо-проучени хабитати. Но докторантката се е справила. Акцентът безспорно е поставен на тези с човешки произход - от кърма. Радостен е фактът, че е създадена колекция от щамове МКБ, които могат и в бъдеще да се доразработват в катедрата по Обща и промишлена микробиология.

Морфологичната (макроморфологична по тип колонии и микроморфологична - полиморфизъм на клетката, определени микроскопски) и физиологична вариабилност са оценени в рамките на търсените представители на род *Lactobacillus* и новосформираните родове. Докторантката се е съобразила с тази таксономична новост и детайлно представя данните за голяма група от чистите култури от кърма (*Приложение 7 а-б*). Това важи и за *Приложение 8 (а-б)* –описващи морфологична характеристика на изолати от ферментирали зеленчукови храни и *Приложение 9 (а-б)*

за сурово сушени меса. Те са системно и много добре представени, но са обемни и докторантката е преценила като по-удачно да ги остави в края на 210 стр. труд. Като основополагащ етап от идентификацията на всяка новоизолирана чиста култура/щам затова оценявам тази информация като важна част от раздела *Резултати и обсъждане*, защото те много добре илюстрират морфологичното разнообразие в това слабо проучено местообитание. Безспорно извършена е огромна по обем експериментална работа. Комбинирайки различни молекулярно-генетични методи 47 изолата (от общо 64чисти култури МКБ), от трите групи проби (кърма, ферметирали зеленчукови храни и сурово-сушени меса), са таксономично отнесени към семейство *Lactobacillaceae* и по-конкретно към родовете: *Lactiplantibacillus* (24 изолата), *Lactobacillus* (13 изолата) и *Lacticaseibacillus* (10 изолата). В табл. 28 коректно са посочени избраните за охарактеризиране на пробиотичния потенциал новоизолирани щамове.

В оценката на подбраната група Йорданка Дерменджиева успешно съчетава изискваните *in vitro* критерии (съгласно ЕФСА, 2002) за безопасност, функционалност и технологична приложимост. Добре изпълнени са скрининговите *in vitro* тестове за усвояването на пребиотици, за оценка продукцията на  $H_2O_2$  и антагонистични вещества, за подкисляване на средата като фактор в ограничаване на патогените. Докторантката познава проблема с превенцията на разрастването на антибиотичната резистентност и правилно оценява спектрите на антибиотична чувствителност в групата на кандидат - пробиотичните щамове. Експерименталната постановка е правилна, даните са ясно представени и дискутирани в светлината на най-новата концепция по проблема. Така трудът успешно фокусира върху постигнатите резултати и те еднозначно могат да се сравнят с данните от литературата към днешна дата. Докторантката може по-смело да анализира и обобщава полезните качества на новоохарактеризираните МКБ, с оглед на факта, че това са нови данни за недопроучени екологични ниши. Независимо от многото научни изследвания, до момента няма еднозначен отговор за доминиращата роля на водороден пероксид (НР+) продуциращите лактобацили, в някои хабитати. Добре е да бъде цитиран и българския опит в някои от проучените аспекти. Обещаващи резултати са получени по оценка спектъра на антагонистична активност, който в комбинация с оцененния агрегационен фенотип и хидрофобност оформят широк пробиотичен потенциал на щамовете.

Оригинален елемент на дисертационния труд е кохезията между класическа микробиология на кандидат пробиотични български МКБ (от изолирането до техния пробиотичен подбор) и експериментална оценка на широк набор комерсиални

пробиотични продукти, вкл. и от наш производител по показатели касаещи най-популярните дозови форми. Това поставя основата за своеобразно надграждане на темата.

С практическо значение и научна стойност са получените резултати по изследване на факторите, повлияващи стабилността на пробиотичен продукт. Задачите по тази ос са осъществени с много голям брой проби в нужния брой повторения и мащаб. Отново бих препоръчала, след защитата по възможност да се обработят статистически анализ, и да станат обект на публикация. Това обемно и правилно осъществено изследване заслужава да стане достояние на широката научна общност у нас и в чужбина.. Още повече, че в литературата, вероятно заради фирмено know how рядко се открива подобна информация.

Направените 18 извода и 5 приноса са логично следствие от цялата разработка и дават обективна информация за стойността на проведените изследвания. Докторантката формира изводи по всяка от формулираните задачи, поради което техния брой е толкова голям и съответства на брой за голяма докторска теза.

Приемам с адмирации приносите на разработката и съм убедена, че те ще намерят реално практическо приложение, за да подпомогнат работата на българските микробиолози за създаване на нови и по-добри пробиотични препарати.

В заключение на гореизложеното искам да подчертая, че материалът е актуален, обемен и изпълнява напълно изискванията на ЗРАСРБ и Правилниците към него. Темата е актуална, изследванията са проведени методично правилно, получените резултати са солидна база за следващи научни и приложни разработки. Открояват се оригинални научни и приложни приноси. Всичко това ми дава основание за цялостна висока оценка на дисертационния труд.

**Убедено предлагам на уважаемото научно жури и на членовете на Факултетния съвет на Биологически факултет да оценят по достойнство разработения дисертационен труд за и да гласуват положително за присъждане на образователна и научна степен “Доктор” в област 4. „Природни науки, математика и информатика; професионално направление 4.3. „Биологически науки“ Докторантска програма: “Микробиология“ на Йорданка Димитрова Дерменджиева.**

17.04.2022 г.

Рецензент:.....

(проф. С. Данова, дбн)