

**СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ „СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ“**

**БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ**

**КАТЕДРА „ОБЩА И ПРОМИШЛЕНА МИКРОБИОЛОГИЯ“**



## **А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен  
„Доктор“

Професионално направление: 4.3. Биологични науки

Докторска програма: Микробиология

**ТЕМА: ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПРОБИОТИЧНИЯ ПОТЕНЦИАЛ  
НА МЛЕЧНОКИСЕЛИ БАКТЕРИИ С РАЗЛИЧЕН ПРОИЗХОД**

**Йорданка Димитрова Дерменджиева**

**Научен ръководител:**

**проф. д-р Петя Христова**

**Научно жури:**

доц. д-р Траяна Недева  
проф. д-р Петя Христова  
проф. д-р Светла Данова  
доц. д-р Цветелина Паунова  
проф. д-р Мария Ангелова

София, 2022 г.



Дисертационният труд е представен на 210 стандартни машинописни страници и съдържа 40 таблици, 30 фигури и 9 приложения. Библиографската справка включва 206 литературни източника.

Експерименталните изследвания са проведени в лабораториите на катедра „Обща и промишлена микробиология“ към Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски“ и в Микробиологичната лаборатория на фирма „Кенди“ ООД.

Дисертационният труд е обсъден и приет на заседание на катедра „Обща и промишлена микробиология“ към Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски“, състояло се на 11.01.2022 г.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на \_\_ . \_\_ . \_\_\_\_ г.  
от \_\_ : \_\_ часа в .....



*Изказвам искрената си благодарност на проф. д-р Петя Христова, под чието ръководство изготвих настоящия дисертационен труд.*

*Благодаря на гл. ас. д-р Илияна Рашева и на гл. ас. д-р Йоана Кижева, както и на целия колектив на Лаборатория 117 към катедра „Обща и промишлена микробиология“ за методичните насоки, които получих в хода на усвояването на нови практически умения.*

*Искрено благодаря на ръководството на фирма „Кенди“ ООД, от чийто екип бях част по време на изготвянето на дисертационния си труд, за осигурената възможност за развитие, както и на колектива на Микробиологичната им лаборатория за проявеното разбиране.*

*Благодаря на доброволците, включили се безвъзмездно в пробонабирането на биологичните материали, станали обект на изследване в настоящия дисертационен труд.*

*Не на последно място, изказвам дълбока благодарност на семейството си за оказаната безрезервна подкрепа.*



## ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection / Американска колекция на типови култури
<b>BB</b>	Bifidobacterium broth / Бульон за бифидобактерии
<b>CFU</b>	Colony forming unit / Колонообразуваща единица
<b>MRS</b>	Среда за <i>Lactobacillus</i> на DE MAN, ROGOSA and SHARPE
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline / Фосфатен буфер
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction / Полимеразна верижна реакция
<b>PUM буфер</b>	Phosphate urea magnesium sulphate buffer / Фосфатен буфер с урея и магнезиев сулфат
<b>PVC</b>	Поливинилхлорид
<b>R&amp;D</b>	Research and Development / Развитие и внедряване
<b>TAMC</b>	Total aerobic microbial count / Общ брой аеробни микроорганизми
<b>TOS + MUP</b>	TOS-propionate agar medium + Mupirocin / TOS-пропионат агар + Мупиросин
<b>TYMC</b>	Total yeasts and mould count / Общ брой плесени и дрожди
<b>МКБ</b>	Млечнокисели бактерии
<b>НБПМКК</b>	Национална банка по промишлени микроорганизми и клетъчни култури
<b>СО</b>	Стандартно отклонение



## УВОД

Съвременният подход за изучаване на биологията на човека го разглежда като „супероганизъм“, съставен от човешки и микробиални клетки, чийто функционален потенциал надвишава сбора на индивидуалните еукариотни и прокариотни възможности. Микроорганизмите, нормално обитаващи човешкото тяло са съпътствали гостоприемника си през всички етапи на филогенетичното му развитие. В резултат съвместната им еволюция е презицирала биологичните механизми, с които микроорганизмите повлияват физиологичните и поведенчески функции на човека. Фундаменталната значимост на микробиотата за качеството и продължителността на човешкия живот е във съмнение, но научният интерес към нея не стихва.

Биоразнообразието и количественият състав на микрофлората в различни участъци от човешкото тяло са специфични и относително постоянни и зависят от условията за развитие, които предлага съответната екологична ниша. Въпреки че уточняването на състава на човешката микробиота все още не е пълно, ясно е, че представители на млечнокиселите бактерии са изключително доминантно представени в стомашно-чревния тракт, влагалището и устната кухина и вземат активно участие в поддържането на здравословната им хомеостаза. Численият превес на млечнокисели бактерии в тези динамични екосистеми лесно може да бъде повлиян негативно от редица фактори, а допълнителният им прием е залегнал в превенцията и лечението на множество заболявания и състояния, дължащи се на микробиален дисбаланс в един или няколко биотопа на човешкото тяло.

Консумацията на традиционни естествено ферментирани храни, богати на млечнокисели бактерии е част от храненето на човека, далеч преди да познава ползите от приема им. Днес забързаността на съвременното ежедневие насочва вниманието към леснодостъпните готови търговски форми на функционални храни и пробиотични хранителни добавки, съдържащи високи концентрации жизнеспособни клетки. Така пред микробиолози и биотехнолози се очертава предизвикателството да изолират млечнокисели бактерии от подходящи естествени екологични ниши, да селектират щамове след задълбочена характеристика на пробиотичния им потенциал и да ги



предложат на пазара в подходяща форма, запазваща жизнеспособността и физиологичната им ефективност.

Това предизвикателство очерта и целта на настоящия дисертационен труд – да допринесе за едно комплексно изследване на биоразнообразието, таксономичния статус и биологичния потенциал на млечнокисели бактерии, изолирани от недобре проучени до момента в България екологични ниши и да изследва факторите, повлияващи качеството и стабилността на пробиотичните продукти.



## ЦЕЛ

Целта на настоящия дисертационен труд е да проведе комплексно изследване на биоразнообразието, таксономичния статус и пробиотичния потенциал на млечнокисели бактерии, изолирани от недобре проучени до момента в България човешки (майчина кърма), растителен (спонтанно ферментирали зеленчукови храни) и животински (сурово-сушени меса) биотопи и да изследва факторите, повлияващи качеството и стабилността на пробиотичните продукти.

## ЗАДАЧИ

За постигането на определената цел бяха очертани четири основни оси на изследване, включващи експерименталните задачи, както следва:

### **1. Изолиране и идентификация на млечнокисели бактерии от кърма, ферментирали зеленчукови храни и сурово-сушени меса**

- 1.1. Избор на екологични ниши, некомпromетирано набиране на проби и коректно снемане на информация от доброволците.
- 1.2. Обща микробиологична характеристика на проби кърма.
- 1.3. Изолиране на чисти култури потенциални млечнокисели бактерии и тяхната фенотипна характеристика.
- 1.4. Молекулярно-генетична идентификация на изолираните култури за определяне на принадлежността им към групата на млечнокиселите бактерии.
- 1.5. Създаване, съхранение и поддържане на колекция новоизолирани щамове млечнокисели бактерии.



**2. Оценка на безопасността на новоизолирани щамове млечнокисели бактерии като основен критерий за потенциалното им включване в пробиотичен продукт**

2.1. Определяне на антибиотичната резистентност на изследваните щамове.

2.2. Изследване на хемолизната активност на изследваните щамове.

**3. Оценка на пробиотичния потенциал на новоизолирани щамове млечнокисели бактерии**

3.1. Оценка на способността на изследваните щамове да подкисляват средата.

3.2. Определяне на способността на тестваните щамове да продуцират водороден пероксид.

3.3. Определяне на антимикробната активност на тестваните щамове срещу референтните тест-култури на Грам-отрицателни, Грам-положителни бактерии и дрожди.

3.4. Изследване на агрегационния фенотип на тестваните щамове.

3.5. Оценка на повърхностните характеристики на изследваните щамове – хидрофобност.

3.6. Изследване на способността на изолираните щамове да продуцират екзополисахариди.

3.7. Оценка на способността на изследваните щамове да формират протективен биофилм.

3.8. *In vitro* определяне на транзитната толерантност на изследваните щамове към действието на пепсин и панкреатин чрез симулиране на условията на гастро-интестинален тракт.

3.9. Определяне на способността на изследваните щамове да усвояват пребиотик.

**4. Изследване на възможностите за разработване на качествен и стабилен пробиотичен продукт**

4.1. Преглед и оценка на качеството на пробиотични продукти, предлагани на българския и международния пазар.

4.2. Оценка на факторите, повлияващи стабилността на пробиотичен продукт в капсула при съхранение на стайна температура.





## МАТЕРИАЛИ

### 1. Микроорганизми

#### 1.1. Колекция новоизолирани шамове млечнокисели бактерии

В обхвата на настоящия дисертационен труд от изследваните екологични ниши (кърма, естествено ферментирали зеленчукови храни, сурово-сушени меса) са изолирани и идентифицирани общо 47 щама млечнокисели бактерии. Оценени са безопасността и пробиотичния потенциал на 25 от тях, посочени в Таблица 11.

#### 1.2. Референтни тест-микроорганизми

В хода на изпитванията за оценка на пробиотичния потенциал на новоизолираните млечнокисели бактерии са използвани референтните тест-микроорганизми, посочени в Таблица 1.

**Таблица 1: Референтни тест-микроорганизми**

Тест-микроорганизъм	Колекция / Щам	Предоставен от
<i>Escherichia coli</i>	ATCC / 8739	НБПМКК
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i>	ATCC / 14028	НБПМКК
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC / 6538	НБПМКК
<i>Candida albicans</i>	ATCC / 10231	НБПМКК

### 2. Хранителни среди, реактиви и разтвори

### 3. Търговски комплекти (китове) за идентификация

### 4. Антибиотични дискове

### 5. Пробиотични крайни продукти

### 6. R&D мостри (Развитие и Внедряване) на пробиотични продукти

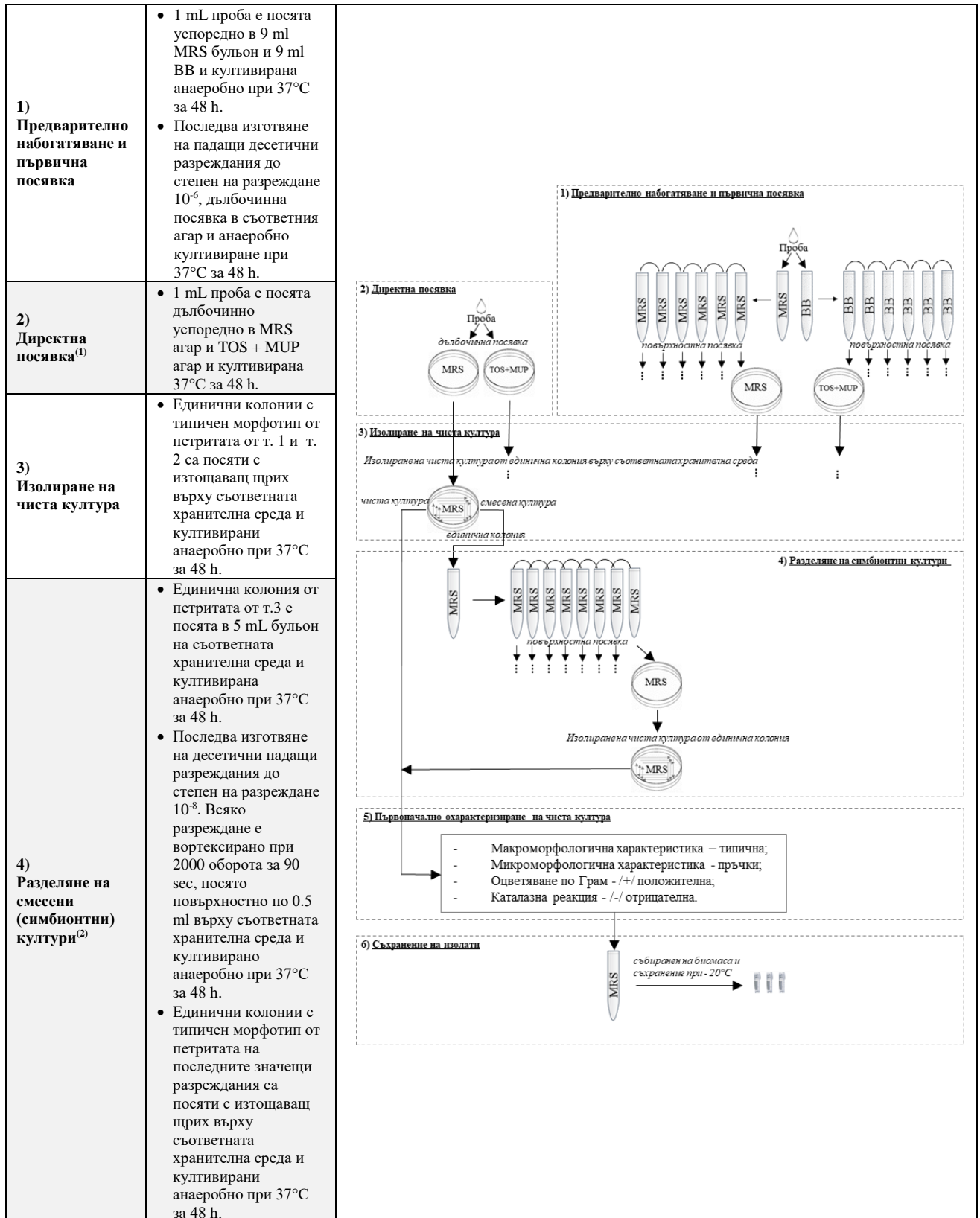
### 7. Апаратура



## МЕТОДИ

- 1. Набиране на проби от изследваните екологични ниши – кърма, ферментирани зеленчукови храни и сурово-сушени меса.**
- 2. Обща микробиологична характеристика на проби от кърма**
  - 2.1. Определяне на общ брой млечнокисели бактерии в проби от кърма (ISO 7889:2005/IDF 117:2005 и ISO 29981:2010/IDF 220:2010)**
  - 2.2. Определяне на микробно качество (микробно замърсяване) на проби от кърма (Ph. Eur. 2.6.12 и 2.6.13)**
- 3. Изолиране на чисти култури потенциални млечнокисели бактерии**

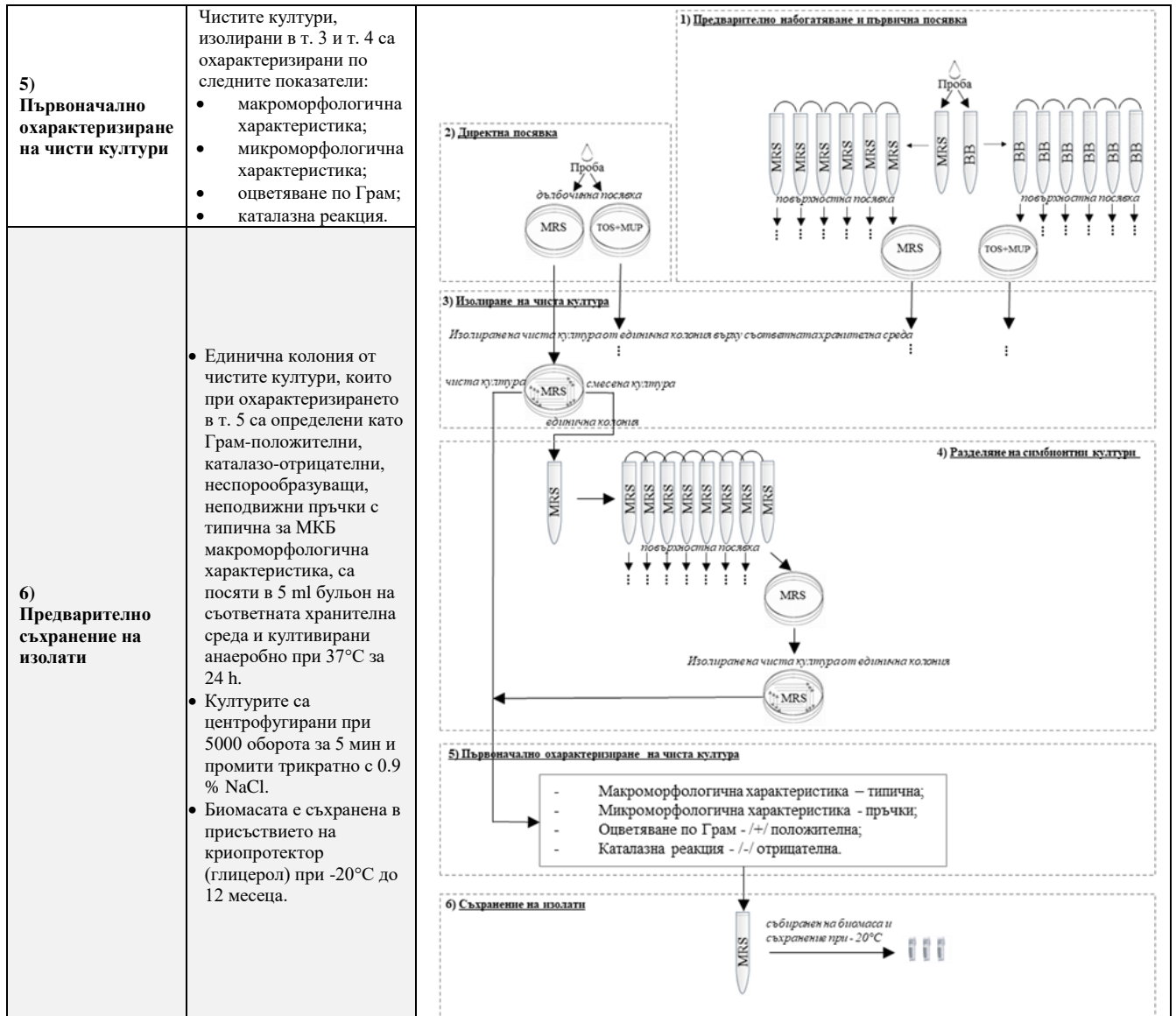
За целта е разработена, а в хода на изследването и оптимизирана методика, чиито шест етапа са представени и описани на Фигура 1.
- 4. Фенотипна характеристика (ISO 9232:2005 / IDF 146:2005)**
  - 4.1. Макроморфологична и микроморфологична характеристика**
  - 4.2. Каталазна реакция в бульон**
  - 4.3. Индол тест**
  - 4.4. Развитие в лакмусово мляко при 37°C**
  - 4.5. Развитие в MRS бульон при 15°C и 45°C**
  - 4.6. Отделяне на въглероден диоксид**
  - 4.7. Биохимична идентификация с BD BBL Crystal ID.**
- 5. Молекулярно-генетична идентификация**
  - 5.1. Родово типирание чрез PCR амплификация на интергенни участъци от единична колония и ДНК (Kabadjova *et. al.*, 2002)**
  - 5.2. Изолиране на ДНК**
  - 5.3. Multiplex PCR амплификация с групово-специфични праймери (Song *et al.*, 2000)**
  - 5.4. PCR амплификация с видово специфични праймери за *L. plantarum* (Drisko *et al.*, 2005)**
  - 5.5. 16S PCR амплификация, секвениране и секвенционен анализ**



**Фигура 1а: Изолране на чисти култури потенциални млечнокисели бактерии**

Легенда: (1) Този етап е приложен само за проби от кърма;

(2) Този етап е приложен само за културите, които са определени като нееднородни на етап 3).



Фигура 16: Изолране на чисти култури потенциални млечнокисели бактерии

**6. Създаване, съхранение и поддръжане на колекция новоизолирани щамове млечнокисели бактерии**

7. Антибиотична резистентност (Bauer *et. al* 1996)

8. Хемолитна активност (Ruy and Chang, 2013)

9. Подкисляване на средата (Hwanhlem *et al.*, 2011)

10. Продукция на водороден пероксид (Maldnado *et. al.*, 2012)

11. Антимикробна активност (Ivanova *et. al.*, 1998)

12. Агрегационен фенотип – автоагрегация и ко-агрегация (Kmet and Lucchini, 1997)

13. Повърхностна характеристика – хидрофобност (Schar-Zammaretti *et. al.*, 2003)



14. **Продуциране на екзополisahариди (Paulo *et al.*, 2012)**
15. **Формиране на биофилм (Gomez *et al.*, 2016)**
16. **Транзитна толерантност към пепсин (pH 2.0) и панкреатин (pH 8.0) (Charteris *et al.*, 1998)**
17. **Усвояване на пребиотик – инулин (Mandadzhieva *et al.*, 2014)**
18. **Оценка на качеството на пробиотични крайни продукти**
- 18.1. **Общ брой пробиотични микроорганизми (ISO 7889:2005/IDF 117:2005 и ISO 29981:2010/IDF 220:2010)**
- 18.2. **Съдържание на влага (ISO 5537:2004)**
19. **Оценка на стабилността на R&D мостри на пробиотични продукти в капсула**
- 19.1. **Външен вид (БДС 15612:1983)**
- 19.2. **Съдържание на влага (ISO 5537:2004)**
- 19.3. **Общ брой пробиотични микроорганизми (ISO 7889:2005/IDF 117:2005 и ISO 29981:2010/IDF 220:2010)**
- 19.4. **Степен на редукция**



## РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

### Изолиране и идентификация на млечнокисели бактерии от кърма, ферментирали зеленчукови храни и сурово-сушени меса

#### 1. Избор на екологични ниши, некомпromетирано набиране на проби и коректно снемане на информация от доброволците

Изследванията в настоящия дисертационен труд са проведени със следните групи проби:

- 11 проби от кърма от клинично здрави жени;
- 11 проби от естествено ферментирали зеленчукови храни, изготвени по домашни рецепти;
- 5 проби от домашно приготвени сурово-сушени меса и колбаси.

Събирането на различните групи проби е съпроводено със снемане на информация за историята на доброволците, взели участие в пробонабирането от кърма, както и такава за произхода и състава на туршиите и колбасите. Събраната информация е представена в Таблица 2, Таблица 3 и Таблица 4.



Таблица 2: История на доброволките, взели участие в пробонабирането от кърма

Проба	001	002	003	004	005	006	007	008	009	010	011
Възраст на майката (години)	34	25	29	27	33	33	30	31	28	30	31
Брой успешни бременности	1	1	1	1	1	1	1	4	2	3	4
Възраст на последно роденото дете (месеца)	16	6	3	4	1	0	9	5	5	6	6
Гестационна седмица, в която е родено последното дете	38	39	40	39	38	38	39	40	37	41	40
Родоразрешение при последното раждане <sup>(1)</sup>	ЦС	ЦС	ВР	ЦС	ЦС	ЦС	ВР	ВР	ЦС	ВР	ВР
Етап на лактация <sup>(2)</sup>	З→И	З	У→З	З	У	ПМ	З	З	З	З	З
Диагностицирано заболяване на млечните жлези	Не	Не	Не	Не	Не	Не	Не	Не	Не	Не	Не
Специфики на диетата при последната бременност и период на лактация	Не	Не	Не	Не	Не	Не	Не	Да <sup>(3)</sup>	Да <sup>(4)</sup>	Да <sup>(5)</sup>	Да <sup>(3)</sup>
Прием на пробиотици по време на последната бременност и период на лактация	Да	Не	Не	Не	Да, понякога	Да, понякога	Не	Да, понякога	Да	Не	Да, понякога
Прием на медикаменти по време на последната бременност и период на лактация	Не	Не	Да <sup>(6)</sup>	Не	Не	Не	Не	Да <sup>(7)</sup>	Не	Да <sup>(8)</sup>	Да <sup>(7)</sup>
Тютюнопушене по време на последната бременност и период на лактация	Не	Не	Да, рядко	Не	Не	Не	Не	Не	Не	Не	Не
Прием на алкохол по време на последната бременност и период на лактация	Не	Не	Да, рядко	Не	Да, рядко	Да, рядко	Не	Да, рядко	Не	Не	Да, рядко
Местожителство по време на последната бременност и период на лактация	обл. Пазарджик, гр. Пещера	обл. Пазарджик, гр. Пещера	обл. Пазарджик, гр. Пещера	обл. Софийска, гр. Божурище	обл. София, гр. София	обл. София, гр. София	обл. София, гр. София	обл. София, гр. София	обл. София, гр. София	обл. София, гр. София	обл. София, гр. София
Отклонение от инструкцията за пробовземане	Не	Не	Не	Да <sup>(9)</sup>	Не	Да <sup>(9)</sup>	Не	Не	Не	Не	Не

Легенда: (1) Родоразрешение:

ЦС – Цезарово сечение;  
ВР – Вагинално раждане.

(2) Етапи на лактация:

К – Образуване на коластра;  
ПМ – Преходно мляко;  
У – Установяване;  
З – Зрялост;  
И – Инволюция.

(3) Нисковъглеродна диета.

(4) Без захар.

(5) Редовен прием на кефир.

(6) „Парацетамол“.

(7) Антибиотик, витамини и минерали.

(8) Витамини и минерали.

(9) Пробовземане с помпа за кърма.



**Таблица 3: Състав и произход на изследваните ферментирани зеленчукови храни**

Проба	Състав		Регион
	Зеленчуци	Саламура	
300	бяло зеле червено зеле	4 % w/v разтвор на вода от водоснабдителната мрежа и NaCl	област Кюстендил, гр. Дупница
301	бяло зеле ябълка дюля червено цвекло синапено семе хрян	3 % w/v разтвор на вода от водоснабдителната мрежа и NaCl	област София, гр. София
302	бяло зеле червено зеле	6 % w/v разтвор на вода от водоснабдителната мрежа и NaCl	област София, с. Доброславци
303	бяло зеле	3 % w/v разтвор на вода от водоснабдителната мрежа и NaCl	област София, с. Доброславци
304	бяло зеле	3 % w/v разтвор на вода от водоснабдителната мрежа и NaCl	област София, с. Доброславци
305	бяло зеле	2 % w/v разтвор на вода от водоснабдителната мрежа и NaCl	област София, с. Доброславци
306	бяло зеле	2 % w/v разтвор на вода от водоснабдителната мрежа и NaCl	област Плевен
307	бяло зеле	1 % w/v разтвор на вода от собствен водоизточник и NaCl	област София, гр. Божурище
308	бяло зеле	разтвор на преварена вода от собствен водоизточник и NaCl в неуточнена концентрация	област София, гр. Божурище
309	бяло зеле моркови карфиол зелен домати зелена чушка червено цвекло	1 % w/v разтвор на вода от водоснабдителната мрежа и NaCl	област Пловдив, гр. Пещера
310	бяло зеле моркови	1 % w/v разтвор на вода от водоснабдителната мрежа и NaCl	област Пловдив, гр. Пещера

**Таблица 4: Състав и произход на изследваните сурово-сушени меса**

Проба	Продукт	Състав	Произход на месото	Регион
601	Пастърма	телешко филе морска сол сушени подправки (черен пипер, червен пипер, чубрица)	Частен животновъд от гр. Якоруда	област Благоевград, гр. Якоруда
602	Луканка	свински гърди подправки	Месото е закупено и колбасът е приготвен в специализиран магазин за колбаси	област Сливен, гр. Нова Загора
603	Суджук	свинско месо подправки	Домашно отглеждано животно	област Перник, с. Дивотино
604	Суджук	свинско месо телешко месо подправки	Частен животновъд	област София, с. Негушево
605	Суджук	еленско месо глиганско месо подправки	Дивечово месо	област София, гр. Етрополе





## 2. Обща микробиологична характеристика на проби от кърма

### 2.1. Общ брой млечнокисели бактерии в проби от кърма (ISO 7889:2005/IDF 117:2005 и ISO 29981:2010/IDF 220:2010)

Определен е общият брой млечнокисели бактерии в проби от кърма на 11 клинично здрави български жени чрез посявка в три хранителни среди, които насочено обхващат трите очаквани групи бактерии – лактобацили (MRS агар), бифидобактерии (TOS+MUP агар) и млечни коки (M17 агар). Получените резултати са представени в Таблица 5. Регистрираните стойности варират между  $< 10^1$  CFU/mL (проба 008) и  $1.2 \times 10^4$  CFU/mL (проба 001), като средно аритметичната стойност по този показател за всички проби е  $2.9 \times 10^3$  CFU/mL. Висок брой ( $> 1 \times 10^3$  CFU/mL) предполагаеми лактобацили е отчетен в проби 001, 004, 006 и 007, предполагаеми бифидобактерии – в проби 001, 003 и 004 и предполагаеми млечни коки – в проба 004. В 3 проби не се откриват данни за присъствие на бифидобактерии (006, 007 и 008). За съжаление в регистрираните резултати не може да се очертае зависимост между броя млечнокисели бактерии в пробите и периода на лактация или начина на родоразрешение. Впечатление прави, че най-ниски нива на млечнокисели бактерии са регистрирани за проби от жените, съобщили, че по време на бременността и/или лактацията се е наложил прием на антибиотици – проба 008 (5 CFU/mL) и проба 011 ( $9.2 \times 10^1$  CFU/mL). Пробата, за която е регистриран най-висок брой млечнокисели бактерии (001 –  $1.2 \times 10^4$  CFU/mL) е от жена, която е заявила редовен прием на пробиотичен продукт по време на бременността и/или лактацията.

### 2.2. Микробно качество (микробно замърсяване) на проби от кърма (Ph. Eur. 2.6.12 и 2.6.13)

Оценено е микробното качество на изследваните проби кърма и присъствието на нехарактерни микроорганизми в тях чрез проследяването на няколко допълнителни показателя – общ брой аеробни мезофилни микроорганизми (ТАМС), общ брой плесени и дрожди (ТУМС), присъствие на Жлъчно-толерантни Грам-отрицателни бактерии, *E. coli*, *Salmonella* sp., *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*. Получените резултати са представени в Таблица 6.

Стойности по показател ТАМС не могат да бъдат разглеждани като микробно замърсяване на кърмата, тъй като част от естествената ѝ микрофлора може да бъде отнесена към групата на аеробните мезофилни микроорганизми (представители от род *Streptococcus*, род *Staphylococcus*, род *Enterococcus* и др.). Съпоставянето на резултати



по този показател с общия брой млечнокисели бактерии, регистрирани при изследването на кърмата показва корелация – най-високи стойности и по двата показателя са регистрирани за проби 001 и 004, а най-ниски – за проби 008 и 011.

Посевките върху хранителна среда за селективно култивиране на род *Staphylococcus* (MSA) дават положителни резултати за всички проби, но наблюдаваният растеж е нетипичен за *St. aureus* и дава основание да отнесем изолатите към групата на манитол-отрицателни стафилококи, характерни за кожната микрофлора – *St. epidermidis*, *St. saprophyticus* и др.

Общият преглед на получените резултати за групата проследени показатели показва ясно, че микробиологично най-високо натоварени са проби 004 и 006, за които единствено не е спазена инструкцията за мануално асептично пробовземане, а кърмата е събрана посредством помпа. Високият брой плесени и присъствието на Грам-отрицателни бактерии в тях еднозначно показват екзогенното контаминиране с нехарактерни микроорганизми на пробите, събрани посредством помпа.

**Таблица 5:** Общ брой млечнокисели бактерии в проби от кърма (ISO 7889:2005/IDF 117:2005 и ISO 29981:2010/IDF 220:2010)

Проба	Резултат (CFU/mL)			
	MRS агар (CO <sup>1</sup> )	TOS + MUP агар (CO <sup>1</sup> )	M17 агар (CO <sup>1</sup> )	Общ брой млечнокисели бактерии
001	4.3 x 10 <sup>3</sup> (0.43)	7.3 x 10 <sup>3</sup> (0.52)	3.2 x 10 <sup>2</sup> (0.61)	1.2 x 10 <sup>4</sup>
002	5.3 x 10 <sup>2</sup> (0.62)	4.1 x 10 <sup>2</sup> (0.42)	2.4 x 10 <sup>2</sup> (0.53)	1.2 x 10 <sup>3</sup>
003	2 x 10 <sup>2</sup> (0.71)	1.1 x 10 <sup>3</sup> (0.42)	6.5 x 10 <sup>1</sup> (0.72)	1.4 x 10 <sup>3</sup>
004	2.8 x 10 <sup>3</sup> (0.52)	6.1 x 10 <sup>3</sup> (0.67)	2.5 x 10 <sup>3</sup> (0.66)	1.1 x 10 <sup>4</sup>
005	5.5 x 10 <sup>1</sup> (0.71)	6.5 x 10 <sup>1</sup> (0.68)	3.6 x 10 <sup>1</sup> (0.61)	1.6 x 10 <sup>2</sup>
006	1.3 x 10 <sup>3</sup> (0.78)	< 1	8.7 x 10 <sup>2</sup> (0.46)	2.2 x 10 <sup>3</sup>
007	2.2 x 10 <sup>3</sup> (0.64)	< 1	2.9 x 10 <sup>2</sup> (0.62)	2.5 x 10 <sup>3</sup>
008	3	< 1	2	5
009	1.2 x 10 <sup>2</sup> (0.78)	1.1 x 10 <sup>2</sup> (0.54)	2.8 x 10 <sup>1</sup> (0.62)	2.6 x 10 <sup>2</sup>
010	1 x 10 <sup>2</sup> (0.68)	4.1 x 10 <sup>2</sup> (0.72)	1.5 x 10 <sup>1</sup> (0.56)	5.3 x 10 <sup>2</sup>
011	2.4 x 10 <sup>1</sup> (0.82)	2.9 x 10 <sup>1</sup> (0.68)	3.9 x 10 <sup>1</sup> (0.84)	9.2 x 10 <sup>1</sup>

Легенда: CO – Стандартно отклонение.

Таблица 6: Микробно качество (микробно замърсяване) на проби от кърма (Ph. Eur. 2.6.12 и 2.6.13)

Проба	Резултат (CFU/mL)						
	ТАМС, (CO <sup>2</sup> )	ТУМС, (CO <sup>2</sup> )	Жлъчно-толерантни Грам-отр. бактерии	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella sp.</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>St. aureus</i>
001	> 2 x 10 <sup>3</sup> 	1.4 x 10 <sup>2</sup> , (0.68) 	/-/ отс.	/-/ отс.	/-/ отс.	/-/ отс.	/+/ пол. НР <sup>(1)</sup> 
002	6.5 x 10 <sup>2</sup> , (0.67) 	< 10 	/-/ отс.	/-/ отс.	/-/ отс.	/-/ отс.	/+/ пол. НР <sup>(1)</sup> 
003	5.7 x 10 <sup>2</sup> , (0.81) 	< 10 	/+/ пол. НР <sup>(1)</sup>	/-/ отс.	/+/ пол. НР <sup>(1)</sup>	/+/ пол. НР <sup>(1)</sup>	/+/ пол. НР <sup>(1)</sup> 
004	> 4 x 10 <sup>3</sup> 	> 4 x 10 <sup>3</sup> 	/+/ пол. НР <sup>(1)</sup>	/-/ отс.	/+/ пол. НР <sup>(1)</sup>	/+/ пол. НР <sup>(1)</sup>	/+/ пол. НР <sup>(1)</sup> 
005	6.2 x 10 <sup>1</sup> , (0.73) 	5.2 x 10 <sup>1</sup> , (0.48) 	/-/ отс.	/-/ отс.	/-/ отс.	/-/ отс.	/+/ пол. НР <sup>(1)</sup> 
006	> 2 x 10 <sup>3</sup> 	> 2 x 10 <sup>3</sup> 	/+/ пол.	/+/ пол.	/+/ пол. НР <sup>(1)</sup>	/-/ отс.	/+/ пол. НР <sup>(1)</sup> 
007	> 4 x 10 <sup>2</sup> 	> 4 x 10 <sup>2</sup> 	/-/ отс.	/-/ отс.	/-/ отс.	/+/ пол. НР <sup>(1)</sup>	/+/ пол. НР <sup>(1)</sup> 
008	3 x 10 <sup>1</sup> , (0.82) 	< 10 	/-/ отс.	/-/ отс.	/-/ отс.	/-/ отс.	/+/ пол. НР <sup>(1)</sup> 
009	1.4 x 10 <sup>2</sup> , (0.72) 	< 10 	/-/ отс.	/-/ отс.	/-/ отс.	/-/ отс.	/+/ пол. НР <sup>(1)</sup> 
010	5.6 x 10 <sup>2</sup> , (0.84) 	< 10 	/-/ отс.	/-/ отс.	/-/ отс.	/-/ отс.	/+/ пол. НР <sup>(1)</sup> 
011	2.4 x 10 <sup>1</sup> , (0.72) 	5.2 x 10 <sup>1</sup> , (0.65) 	/-/ отс.	/-/ отс.	/-/ отс.	/-/ отс.	/+/ пол. НР <sup>(1)</sup> 

Легенда: (1) НР – Нетипичен растеж (нетипичен за *St. aureus*);  
(2) CO – Стандартно отклонение.

### 3. Изолиране на чисти култури потенциални млечнокисели бактерии и фенотипна характеристика (ISO 9232:2005 / IDF 146:2005)

От изследваните групи проби (кърма, ферментирали зеленчукови храни и сурово-сушени меса) са изолирани общо 142 изолата. Отнасянето на пробите към съответните екологични ниши и броят щамове, изолирани от тях е представено на Таблица 7.

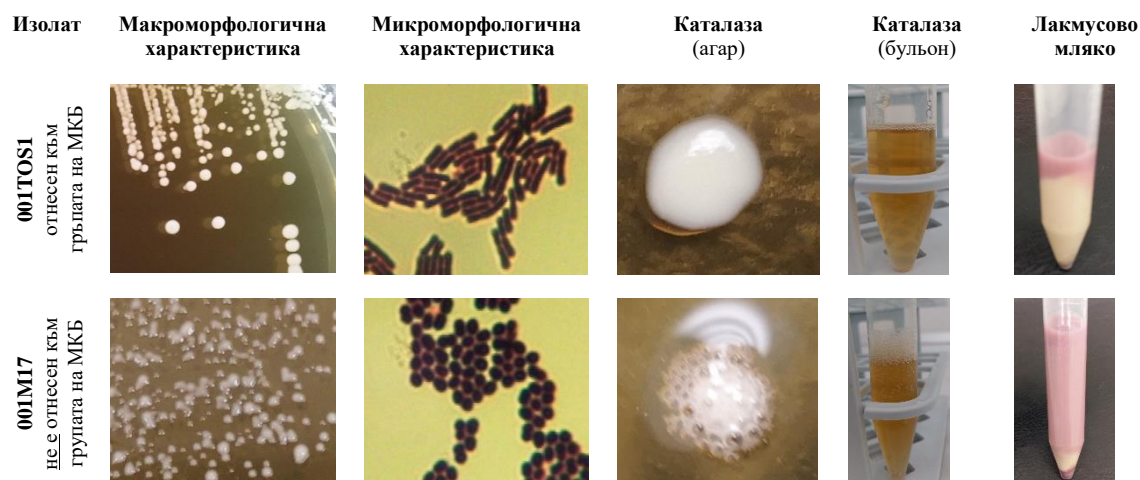
**Таблица 7:** Изолати от изследваните проби и екологични ниши

Екологична ниша / Проби	Изолати			Изолати с нетипичен за групата на МКБ фенотип (брой / % <sup>(2)</sup> )	Изолати с типичен за групата на МКБ фенотип (брой / % <sup>(2)</sup> )
	Общ брой	Смесени култури (брой / % <sup>(1)</sup> )	Чисти култури (брой / % <sup>(1)</sup> )		
Кърма / 11 проби от 001 до 011	56	27 / 48%	29 броя / 52%	14 броя / 48%	15 броя / 52%
Ферментирали зеленчукови храни / 11 проби от 300 до 310	59	0	59 броя / 100%	15 броя / 25%	44 броя / 75%
Сурово-сушени меса / 5 проби от 601 до 605	27	0	27 броя / 100%	22 броя / 81%	5 броя / 19%
Общо за всички екологични ниши	142	27 броя / 19%	115 броя / 81%	51 броя / 44%	64 броя / 56%

Легенда: (1) Процент от общия брой изолати за съответната екологична ниша;

(2) Процент от чистите култури за съответната екологична ниша.

Фенотипът на всички изолирани чисти култури (115 броя) е охарактеризиран по редица морфологични, културални и биохимични показатели, като резултатите на 64 от тях (56%) са типични за групата на млечнокиселите бактерии. Илюстративен пример на някои от оценените фенотипни характеристики е представен на Фигура 2.



**Фигура 2:** Фенотипна характеристика (ISO 9232:2005 / IDF 146:2005) на два изолата от кърма: единият отнесен към групата на МКБ (001TOS1), а другият – не (001M17)



Макроморфологичният профил на изолатите, отнесени към групата на млечнокиселите бактерии (64 броя) е сравнително постоянен – големи кръгли колонии с изпъкнал връх, гладък ръб, бял цвят с блясък и характерен млечнокисел мирис. Сред тях макроморфологично се отличават 010TOS3, 010M174, 011BB3, 603MRS1, 603MRS2, 604MRS3 и 605MRS6, които образуват по-малки и тъмни колонии.

Микроморфологично изолатите са много подобни – средно големи Грам-положителни пръчки, разположени в групи или верижки. Изключение правят изолати 010TOS1, 010TOS2 и 306TOS2, чиито клетки са значително по-дълги.

Всички изолати отнесени на този етап към групата на млечнокиселите бактерии са каталазо-отрицателни, индол-отрицателни, с типична реакция в лакмусово мляко (ACR или ACt), не се развиват при 15°C, развиват се добре при 45°C и не отделят газ.

Биохимичната идентификация на изследваните изолати посредством система BBL Crystal Anaerobe ID отнесе 50 от тях към род *Actinomyces*, 5 – към род *Lactobacillus*, 5 – към род *Eubacterium* и 4 – към род *Clostridium*. Първите два рода са със сходен биохимичен профил в софтуера на системата и често пъти идентификацията на един и същ изолат е отнасяна и към двата таксона. Тъй като използваната система за идентификация е ориентирана основно към клиничната микробиология, в нейната база данни преобладават биохимични профили на коменсали, опортюнисти и патогени за човека, поради което разполага с едва 7 профила за род *Lactobacillus* (за сравнение профилите за род *Clostridium* са 26). Това наложи последващо генотипно охарактеризиране на цялата група изолати, които до този момент са отнесени към групата на млечнокиселите бактерии (64 броя).

#### **4. Молекулярно-генетична идентификация на изолираните култури**

##### **4.1. Молекулярно-генетична идентификация на изолати от кърма**

Генотипното охарактеризиране на всички изолати от кърма, които до този момент са отнесени към групата на млечнокиселите бактерии (15 броя) включва родово типизиране чрез PCR амплификация на интергенните участъци и последващ секвенционен анализ. Получените резултати са представени в Таблица 8.

Петнадесетте изследвани изолата са идентифицирани като представители на три рода от семейство *Lactobacillaceae* – род *Lacticaseibacillus* (10 изолата), род *Lactiplantibacillus* (3 изолата) и род *Lactobacillus* (2 изолата). Те са изолирани от 7 от общо 11 изследвани жени (64%).



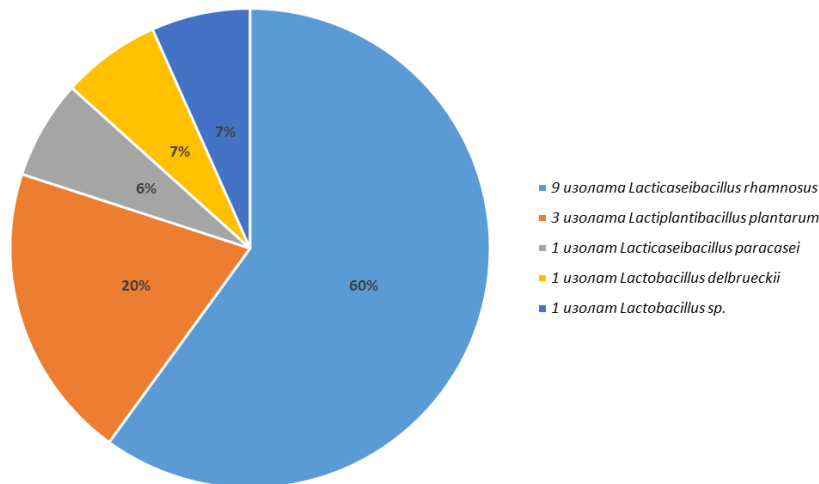
Таблица 8: Молекулярно-генетична идентификация на изолати от кърма

Изолат	Родово типирание чрез PCR амплификация (16S-23S рДНК)		Таксономично отнасяне след 16S PCR → Секвениране
	PCR продукт		
	Колония	ДНК Старт позиция <sup>(2)</sup>	
001TOS	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup> 02 старт – Снимка 1	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> (класифициран преди като <i>Lactobacillus rhamnosus</i> )
001TOS1	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup> 03 старт – Снимка 1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
003MRS	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup> 04 старт – Снимка 1	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> (класифициран преди като <i>Lactobacillus rhamnosus</i> )
003TOS	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup> 05 старт – Снимка 1	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> (класифициран преди като <i>Lactobacillus rhamnosus</i> )
003M17	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup> 06 старт – Снимка 1	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> (класифициран преди като <i>Lactobacillus rhamnosus</i> )
004MRS	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup> 07 старт – Снимка 1	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> (класифициран преди като <i>Lactobacillus rhamnosus</i> )
004TOS	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup> 08 старт – Снимка 1	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> (класифициран преди като <i>Lactobacillus rhamnosus</i> )
007MRS5	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup> 09 старт – Снимка 1	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> (класифициран преди като <i>Lactobacillus rhamnosus</i> )
009TOS2	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup> 10 старт – Снимка 1	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> (класифициран преди като <i>Lactobacillus rhamnosus</i> )
009M173	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup> 11 старт – Снимка 1	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> (класифициран преди като <i>Lactobacillus rhamnosus</i> )
010TOS1	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup> 12 старт – Снимка 1	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> (класифициран преди като <i>Lactobacillus paracasei</i> )
010TOS2	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup> 13 старт – Снимка 1	<i>Lactobacillus sp.</i>
010TOS3	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup> 16 старт – Снимка 1	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (класифициран преди като <i>Lactobacillus plantarum</i> )
010M174	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup> 17 старт – Снимка 1	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (класифициран преди като <i>Lactobacillus plantarum</i> )
011BB3	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup> 18 старт – Снимка 1	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (класифициран преди като <i>Lactobacillus plantarum</i> )

Легенда: (1) PCR продукт, типичен за род *Lactobacillus*;

(2) Стартова позиция на изолата в гел-електрофорезата, представена на Фигура 18 от дисертационния труд.

Видовото разнообразие на лактобацилите, изолирани от кърма включва 9 изолата от вида *Lacticaseibacillus rhamnosus*, 3 изолата от вида *Lactiplantibacillus plantarum*, 1 изолат *Lacticaseibacillus paracasei* и 1 изолат *Lactobacillus delbrueckii* (Фигура 3). Прегледът на резултатите показва, че в кърмата на две от изследваните жени (проба 001 и проба 010) са открити повече от един вид лактобацили.



**Фигура 3:** Видово разнообразие на лактобацилите, изолирани от кърма

Сред изследваните изолати от кърма не са идентифицирани представители от род *Bifidobacterium*, макар че фенотипния им профил и литературната справка го допускаха. Затрудненията, които срещнахме при изолирането на чисти култури от изследваните проби кърма и фактът, че в хода на разделяне на смесените (симбионтните) изолати голяма част от тях бяха загубени ни дава основание да допуснем, без да можем да го докажем, че наблюдаваните пръчковидни бактерии, които не успяхме да култивираме самостоятелно и за които в последствие се установи, че са в тесни асоциации с лактобацили са потенциални представители на род *Bifidobacterium*.

#### 4.2. Молекулярно-генетична идентификация на изолати от ферментирали зеленчукови храни

Генотипното охарактеризиране на всички изолати от ферментирали зеленчукови храни, които до този етап са отнесени към групата на млечнокиселите бактерии (44 броя) стартира с родово типизиране чрез PCR амплификация на интергенните участъци. Предвид очакваното преобладаване на вид *Lactiplantibacillus plantarum* сред тази група изолати и с цел оптимизиране на работната процедура, съответният родово специфичен PCR предшества Multiplex PCR амплификацията, на която са подложени единствено изолатите, които не са отнесени към вида *L. plantarum*. Получените резултати са представени в Таблица 9.

Двадесет и девет изолата (66%) от 7 от общо 11 изследвани проби са отнесени към два рода на семейство *Lactobacillaceae* – род *Lactiplantibacillus* (21 изолата) и род *Lactobacillus* (8 изолата) Останалите 15 изолата не образуват PCR продукти при родово



типирание и не могат да бъдат отнесени към нито един от целевите родове млечнокисели бактерии. Те не са включени в последващите етапи на идентификация.

Двадесет и един от изолатите, отнесени към род *Lactiplantibacillus* (72%) образуват типичен PCR продукт за вида *L. plantarum* при видово специфична амплификация със съответните праймери. Седем от останалите изолати (шест, от които са от една и съща проба) са подложени на Multiplex PCR и получените продукти са близки до типичните за Група I на род *Lactobacillus* по Song *et al.*, 2000 (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* и *L. delbrueckii* subsp. *lactis*).

**Таблица 9а:** Молекулярно-генетична идентификация на изолати от ферментирани зеленчукови храни

Изолат	Родово типирание чрез PCR амплификация (16S-23S рДНК)		Видово специфичен PCR ( <i>L. plantarum</i> )	Multiplex PCR (групиране на род <i>Lactobacillus</i> )	Таксономично отнасяне
	PCR продукт		PCR продукт Старт позиция <sup>(2)</sup>	PCR продукт Старт позиция <sup>(2)</sup>	
	Колония	ДНК Старт позиция <sup>(2)</sup>			
300MRS1	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup> 02 старт – Снимка 2	248 bp <sup>(3)</sup> 02 старт – Снимка 5	НО	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (класифициран преди като <i>Lactobacillus plantarum</i> )
300MRS2	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup> 03 старт – Снимка 2	Липсва продукт 03 старт – Снимка 5	450 bp и 800 bp <sup>(4)</sup> 05 старт – Снимка 6	<i>Lactobacillus</i> sp. (Група I)
300MRS3	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup> 04 старт – Снимка 2	НО	НО	НО
<u>300TOS1</u>	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup> 05 старт – Снимка 2	248 bp <sup>(3)</sup> 04 старт – Снимка 5	НО	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (класифициран преди като <i>Lactobacillus plantarum</i> )
300TOS2	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup> 06 старт – Снимка 2	248 bp <sup>(3)</sup> 05 старт – Снимка 5	НО	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (класифициран преди като <i>Lactobacillus plantarum</i> )
300TOS3	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup> 07 старт – Снимка 2	248 bp <sup>(3)</sup> 06 старт – Снимка 5	НО	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (класифициран преди като <i>Lactobacillus plantarum</i> )
301MRS1	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup> 08 старт – Снимка 2	248 bp <sup>(3)</sup> 07 старт – Снимка 5	НО	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (класифициран преди като <i>Lactobacillus plantarum</i> )
301MRS3	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup> 09 старт – Снимка 2	248 bp <sup>(3)</sup> 08 старт – Снимка 5	НО	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (класифициран преди като <i>Lactobacillus plantarum</i> )
301MRS4	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup> 10 старт – Снимка 2	248 bp <sup>(3)</sup> 09 старт – Снимка 5	НО	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (класифициран преди като <i>Lactobacillus plantarum</i> )
301TOS1	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup> 11 старт – Снимка 2	248 bp <sup>(3)</sup> 11 старт – Снимка 5	НО	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (класифициран преди като <i>Lactobacillus plantarum</i> )

**Легенда:** (1) PCR продукт, типичен за род *Lactobacillus*;

(2) Стартова позиция на изолата в гел-електрофорезата, представена на Фигура 18 от дисертационния труд;

(3) PCR продукт, типичен за *L. plantarum*;

(4) PCR продукт, типичен за група I;

НО – Не е определено.





Таблица 96: Молекулярно-генетична идентификация на изолати от ферментирани зеленчукови храни

Изолат	Родово типирание чрез PCR амплификация (16S-23S рДНК)		Видово специфичен PCR ( <i>L. plantarum</i> )	Multiplex PCR (групиране на род <i>Lactobacillus</i> )	Таксономично отнасяне
	PCR продукт		PCR продукт Старт позиция <sup>(2)</sup>	PCR продукт Старт позиция <sup>(2)</sup>	
	Колония	ДНК Старт позиция <sup>(2)</sup>			
301TOS2	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup> 12 старт – Снимка 2	248 bp <sup>(3)</sup> 12 старт – Снимка 5	НО	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (класифициран преди като <i>Lactobacillus plantarum</i> )
301TOS3	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup> 13 старт – Снимка 2	248 bp <sup>(3)</sup> 13 старт – Снимка 5	НО	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (класифициран преди като <i>Lactobacillus plantarum</i> )
302MRS1	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup> 14 старт – Снимка 2	248 bp <sup>(3)</sup> 14 старт – Снимка 5	НО	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (класифициран преди като <i>Lactobacillus plantarum</i> )
302MRS2	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup> 15 старт – Снимка 2	248 bp <sup>(3)</sup> 15 старт – Снимка 5	НО	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (класифициран преди като <i>Lactobacillus plantarum</i> )
302MRS3	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	Липсва продукт 16 старт – Снимка 2	НО	НО	НО
302MRS4	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup> 02 старт – Снимка 3	248 bp <sup>(3)</sup> 17 старт – Снимка 5	НО	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (класифициран преди като <i>Lactobacillus plantarum</i> )
303MRS1	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup> 03 старт – Снимка 3	248 bp <sup>(3)</sup> 19 старт – Снимка 5	НО	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (класифициран преди като <i>Lactobacillus plantarum</i> )
303MRS4	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup> 04 старт – Снимка 3	Липсва продукт 22 старт – Снимка 5	450 bp и 800 bp <sup>(4)</sup> 06 старт – Снимка 6	<i>Lactobacillus</i> sp. (Група I)
304MRS2	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup> 05 старт – Снимка 3	248 bp <sup>(3)</sup> 23 старт – Снимка 5	НО	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (класифициран преди като <i>Lactobacillus plantarum</i> )
304MRS3	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup> 06 старт – Снимка 3	248 bp <sup>(3)</sup> 25 старт – Снимка 5	НО	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (класифициран преди като <i>Lactobacillus plantarum</i> )
304MRS4	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	Липсва продукт 07 старт – Снимка 3	НО	НО	НО
306MRS1	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	Липсва продукт 08 старт – Снимка 3	НО	НО	НО
306MRS2	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	Липсва продукт 09 старт – Снимка 3	НО	НО	НО
306MRS3	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup> 10 старт – Снимка 3	248 bp <sup>(3)</sup> 31 старт – Снимка 5	НО	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (класифициран преди като <i>Lactobacillus plantarum</i> )
306MRS4	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup> 11 старт – Снимка 3	248 bp <sup>(3)</sup> 32 старт – Снимка 5	НО	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (класифициран преди като <i>Lactobacillus plantarum</i> )
306TOS1	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup> 12 старт – Снимка 3	248 bp <sup>(3)</sup> 33 старт – Снимка 5	НО	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (класифициран преди като <i>Lactobacillus plantarum</i> )
306TOS2	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup> 13 старт – Снимка 3	248 bp <sup>(3)</sup> 34 старт – Снимка 5	НО	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (класифициран преди като <i>Lactobacillus plantarum</i> )

Легенда: (1) PCR продукт, типичен за род *Lactobacillus*;

(2) Стартова позиция на изолата в гел-електрофорезата, представена на Фигура 18 от дисертационния труд;

(3) PCR продукт, типичен за *L. plantarum*;

(4) PCR продукт, типичен за група I;

НО – Не е определено.



Таблица 9в: Молекулярно-генетична идентификация на изолати от ферментирани зеленчукови храни

Изолат	Родово типирание чрез PCR амплификация (16S-23S рДНК)		Видово специфичен PCR ( <i>L. plantarum</i> )	Multiplex PCR (групиране на род <i>Lactobacillus</i> )	Таксономично отнасяне
	PCR продукт		PCR продукт Старт позиция <sup>(2)</sup>	PCR продукт Старт позиция <sup>(2)</sup>	
	Колония	ДНК Старт позиция <sup>(2)</sup>			
306TOS3	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	Липсва продукт 14 старт – Снимка 3	НО	НО	НО
307MRS1	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	Липсва продукт 02 старт – Снимка 4	НО	НО	НО
307MRS3	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	Липсва продукт 03 старт – Снимка 4	НО	НО	НО
307MRS4	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	Липсва продукт 04 старт – Снимка 4	НО	НО	НО
307MRS5	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	Липсва продукт 05 старт – Снимка 4	НО	НО	НО
308MRS1	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup> 06 старт – Снимка 4	Липсва продукт 41 старт – Снимка 5	450 bp и 800 bp <sup>(4)</sup> 07 старт – Снимка 6	<i>Lactobacillus</i> sp. (Група I)
308MRS2	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup> 07 старт – Снимка 4	Липсва продукт 42 старт – Снимка 5	450 bp и 800 bp <sup>(4)</sup> 08 старт – Снимка 6	<i>Lactobacillus</i> sp. (Група I)
308MRS3	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup> 08 старт – Снимка 4	Липсва продукт 43 старт – Снимка 5	450 bp и 800 bp <sup>(4)</sup> 09 старт – Снимка 6	<i>Lactobacillus</i> sp. (Група I)
308MRS4	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup> 09 старт – Снимка 4	Липсва продукт 44 старт – Снимка 5	450 bp и 800 bp <sup>(4)</sup> 10 старт – Снимка 6	<i>Lactobacillus</i> sp. (Група I)
308MRS5	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup> 10 старт – Снимка 4	Липсва продукт 45 старт – Снимка 5	450 bp и 800 bp <sup>(4)</sup> 12 старт – Снимка 6	<i>Lactobacillus</i> sp. (Група I)
308MRS6	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup> 11 старт – Снимка 4	НО	450 bp и 800 bp <sup>(4)</sup> 13 старт – Снимка 6	<i>Lactobacillus</i> sp. (Група I)
309MRS2	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	Липсва продукт 12 старт – Снимка 4	НО	НО	НО
309MRS3	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	Липсва продукт 13 старт – Снимка 4	НО	НО	НО
309MRS4	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	Липсва продукт 16 старт – Снимка 4	НО	НО	НО
309MRS5	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	Липсва продукт 17 старт – Снимка 4	НО	НО	НО
310MRS1	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	Липсва продукт 18 старт – Снимка 4	НО	НО	НО
310MRS5	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	Липсва продукт 19 старт – Снимка 4	НО	НО	НО

Легенда: (1) PCR продукт, типичен за род *Lactobacillus*;

(2) Стартова позиция на изолата в гел-електрофорезата, представена на Фигура 18 от дисертационния труд;

(3) PCR продукт, типичен за *L. plantarum*;

(4) PCR продукт, типичен за група I;

НО – Не е определено.

#### 4.3. Молекулярно-генетична идентификация на изолати от сурово-сушени меса

Генотипното охарактеризиране на петте изолати от сурово-сушени меса, които до този етап бяха отнесени към групата на млечнокиселите бактерии включва родово типирание чрез PCR амплификация и последваща Multiplex PCR амплификация за групиране на лактобацилите. Получените резултати са представени в Таблица 10.

Три от петте изследвани изолати са отнесени към род *Lactobacillus* и в следствие към Група I по Song *et al.*, 2000 (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* и *L. delbrueckii* subsp. *lactis*).



**Таблица 10:** Молекулярно-генетична идентификация на изолати от сурово-сушени меса

Изолат	Родово типирание чрез PCR амплификация (16S-23S рДНК)		Multiplex PCR (групиране на род <i>Lactobacillus</i> ) Старт позиция <sup>(2)</sup>	Таксономично отнасяне
	PCR продукт			
	Единична колония	ДНК Старт позиция <sup>(2)</sup>		
<b>602MRS3</b>	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	Липсва продукт 20 старт – Снимка 4	НО	НО
<b>603MRS1</b>	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup> 21 старт – Снимка 4	450 bp и 800 bp <sup>(3)</sup> 15 старт – Снимка 6	<i>Lactobacillus</i> sp. (Група I)
<b>603MRS2</b>	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup> 22 старт – Снимка 4	450 bp и 800 bp <sup>(3)</sup> 16 старт – Снимка 6	<i>Lactobacillus</i> sp. (Група I)
<b>604MRS3</b>	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	Липсва продукт 23 старт – Снимка 4	НО	НО
<b>605MRS6</b>	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup>	450 bp и 650 bp <sup>(1)</sup> 24 старт – Снимка 4	450 bp и 800 bp <sup>(3)</sup> 18 старт – Снимка 6	<i>Lactobacillus</i> sp. (Група I)

Легенда: (1) PCR продукт, типичен за род *Lactobacillus*;

(2) Стартова позиция на изолата в гел-електрофорезата, представена на Фигура 18 от дисертационния труд;

(3) PCR продукт, типичен за група I.

В обобщение на представените по-горе резултати – посредством приложените молекулярни техники 47 изолата (от общо 64) от трите групи проби (кърма, ферментирани 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 последващите изследвания са включени 25<sup>те</sup> щама, изведени в Таблица 11 – 15 изолата от кърма, 7 изолата от ферментирани зеленчукови храни и 3 изолата от сурово-сушени меса.



Таблица 11: Щамове, чиито пробиотични свойства са изпитани

Произход	Щам		
	Пореден номер	Таксономично отнасяне	Условно обозначение на щам <sup>(1)</sup>
Кърма	1	<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> (класифициран преди като <i>Lactobacillus rhamnosus</i> )	001TOS
	2	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	001TOS1
	3	<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> (класифициран преди като <i>Lactobacillus rhamnosus</i> )	003MRS
	4	<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> (класифициран преди като <i>Lactobacillus rhamnosus</i> )	003TOS
	5	<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> (класифициран преди като <i>Lactobacillus rhamnosus</i> )	003M17
	6	<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> (класифициран преди като <i>Lactobacillus rhamnosus</i> )	004MRS
	7	<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> (класифициран преди като <i>Lactobacillus rhamnosus</i> )	004TOS
	8	<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> (класифициран преди като <i>Lactobacillus rhamnosus</i> )	007MRS5
	9	<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> (класифициран преди като <i>Lactobacillus rhamnosus</i> )	009TOS2
	10	<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> (класифициран преди като <i>Lactobacillus rhamnosus</i> )	009M173
	11	<i>Lactocaseibacillus paracasei</i> (класифициран преди като <i>Lactobacillus paracasei</i> )	010TOS1
	12	<i>Lactobacillus sp.</i>	010TOS2
	13	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (класифициран преди като <i>Lactobacillus plantarum</i> )	010TOS3
	14	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (класифициран преди като <i>Lactobacillus plantarum</i> )	010M174
	15	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (класифициран преди като <i>Lactobacillus plantarum</i> )	011BB3
Ферментирани зеленчукови храни	16	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (класифициран преди като <i>Lactobacillus plantarum</i> )	300TOS1
	17	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (класифициран преди като <i>Lactobacillus plantarum</i> )	301TOS3
	18	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (класифициран преди като <i>Lactobacillus plantarum</i> )	302MRS4
	19	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (класифициран преди като <i>Lactobacillus plantarum</i> )	303MRS1
	20	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (класифициран преди като <i>Lactobacillus plantarum</i> )	304MRS3
	21	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (класифициран преди като <i>Lactobacillus plantarum</i> )	306TOS2
	22	<i>Lactobacillus sp.</i> (Група I)	308MRS4
Сурово-сушени меса	23	<i>Lactobacillus sp.</i> (Група I)	603MRS1
	24	<i>Lactobacillus sp.</i> (Група I)	603MRS2
	25	<i>Lactobacillus sp.</i> (Група I)	605MRS6

Легенда: (1) Условните обозначения на щамовете са формирани от номер на пробата, хранителната среда, от която е изолиран щамът и поредния номер на щам, изолирана от съответните проби и среди.

## Оценка на безопасността на новоизолирани млечнокисели бактерии

### 1. Антибиотична резистентност (Bauer *et. al.*, 1996)

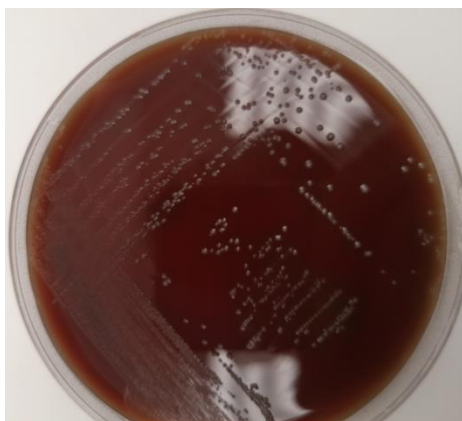
Антибиотичната резистентност на изследваните щамове е определена по диск-дифузионен метод. Получените резултати са представени в Таблица 12.

Всички изследвани щамове са чувствителни към Ампицилин, Хлорамфеникол, Клиндамицин, Еритромицин и Тетрациклин, като към Клиндамицин три щама от кърма (*L. plantarum* 010TOS 3, *L. rhamnisus* 010M174 и *L. plantarum* 011BB3) проявиха умерена чувствителност. Ванкомицинът не повлия развитието на изследваните щамове, с което те потвърдиха своята вродена резистентност към гликопептидните антибиотици. Към групата на аминогликозидните антибиотици изследваните щамове проявиха различна чувствителност – към Канамицин всички са резистентни, към Гентамицин всички са умерено чувствителни, а отношението им към Стрептомицин варира между различните щамове от резистентност до чувствителност.

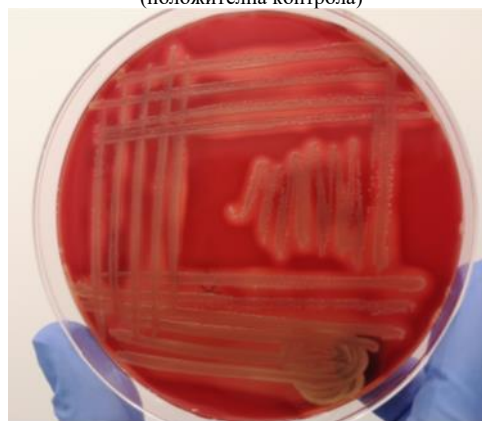
### 2. Хемолизна активност (Ruy and Chang, 2013)

Изследваните двадесет и пет лактобацилни щама не лизират кръвния агар и са определени като хемолитично неактивни ( $\gamma$ -хемолиза). Илюстрация на наблюдаваната културална картина е представена на Фигура 4.

$\gamma$ -хемолиза на *Lactobacillus delbrueckii* 001TOS1



$\beta$ -хемолиза на *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (положителна контрола)



**Фигура 4:** Културална картина при изследване на хемолизна активност



Таблица 12: Антибиотична резистентност (диск-дифузионен метод, Вауер *et. al.*, 1996)

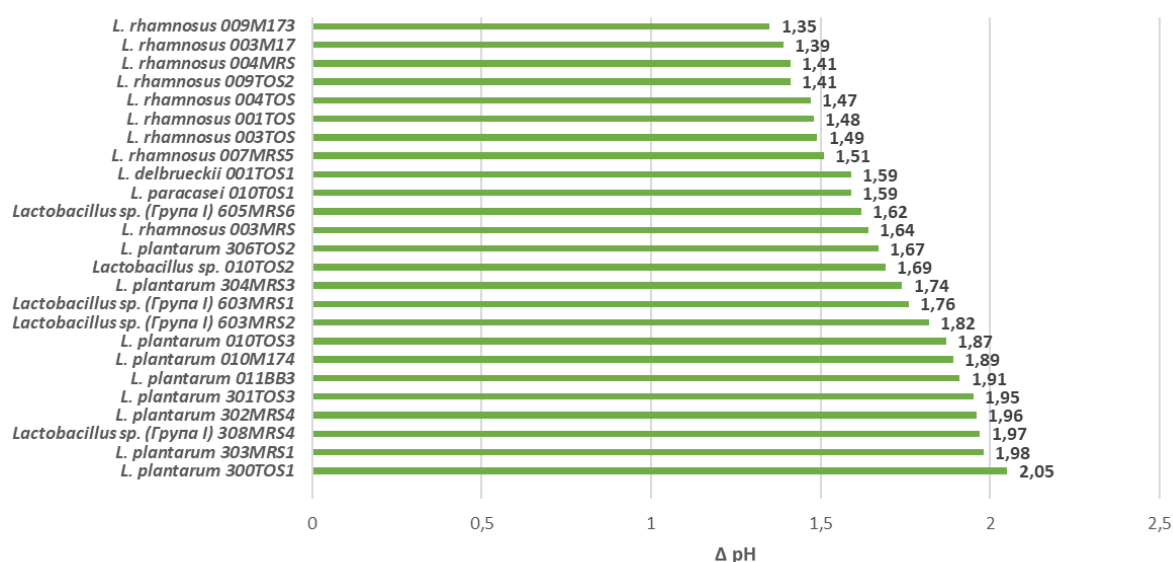
Антибиотик Механизъм на действие Класификация	Инхибитори на синтеза на клетъчна стена		Инхибитори на синтеза на белтъци						
	Пеницилини	Гликопептиди	Амфениколи	Линкозамиди	Макролиди Кетолиди	Аминогликозиди			Тетрациклини Глицилциклини
	Ампицилин (10 µg / диск)	Ванкомицин (5 µg / диск)	Хлорамфеникол (30 µg / диск)	Клиндамицин (2 µg / диск)	Еритромицин (15 µg / диск)	Гентамицин (10 µg / диск)	Канамицин (µg / диск)	Стрептомицин (10 µg / диск)	Тетрациклин (30 µg / диск)
Щам	D на зона на задържане (mm) Степен на чувствителност								
<i>L. rhamnosus</i> 001TOS	30 SS	0 R	31 SS	24 S	29 SS	10 MS	0 R	9 MS	35 SS
<i>L. delbrueckii</i> 001TOS1	30 SS	0 R	30 SS	22 S	29 SS	10 MS	0 R	9 MS	35 SS
<i>L. rhamnosus</i> 003MRS	28 SS	0 R	28 SS	20 S	27 SS	10 MS	0 R	9 MS	34 SS
<i>L. rhamnosus</i> 003TOS	32 SS	0 R	31 SS	25 SS	27 SS	16 MS	0 R	9 MS	33 SS
<i>L. rhamnosus</i> 003M17	30 SS	0 R	28 SS	21 S	28 SS	9 MS	0 R	10 MS	35 SS
<i>L. rhamnosus</i> 004MRS	28 SS	0 R	28 SS	22 S	28 SS	9 MS	0 R	13 MS	35 SS
<i>L. rhamnosus</i> 004TOS	30 SS	0 R	30 SS	25 S	29 SS	10 MS	0 R	15 MS	35 SS
<i>L. rhamnosus</i> 007MRS5	28 SS	0 R	28 SS	22 S	26 SS	9 MS	0 R	9 MS	33 SS
<i>L. rhamnosus</i> 009TOS2	30 SS	0 R	30 SS	24 S	29 SS	9 MS	0 R	14 MS	37 SS
<i>L. rhamnosus</i> 009M173	20 S	0 R	28 SS	22 S	27 SS	9 MS	0 R	9 MS	37 SS
<i>L. paracasei</i> 010TOS1	35 SS	0 R	35 SS	30 SS	30 SS	9 MS	0 R	0 R	32 SS
<i>Lactobacillus sp.</i> 010TOS2	33 SS	0 R	34 SS	32 SS	29 SS	11 MS	0 R	8 MS	32 SS
<i>L. plantarum</i> 010TOS3	28 SS	0 R	29 SS	15 MS	25 S	11 MS	0 R	0 R	27 SS
<i>L. plantarum</i> 010M174	28 SS	0 R	28 SS	14 MS	24 S	9 MS	0 R	0 R	28 SS
<i>L. plantarum</i> 011BB3	30 SS	0 R	28 SS	14 MS	24 S	11 MS	0 R	0 R	27 SS
<i>L. plantarum</i> 300TOS1	26 SS	0 R	45 SS	20 S	34 SS	10 MS	0 R	17 S	40 SS
<i>L. plantarum</i> 301TOS3	25 SS	0 R	43 SS	38 SS	34 SS	12 MS	0 R	12 MS	43 SS
<i>L. plantarum</i> 302MRS4	26 SS	0 R	40 SS	18 S	35 SS	14 MS	0 R	14 MS	37 SS
<i>L. plantarum</i> 303MRS1	28 SS	0 R	45 SS	25 S	40 SS	10 MS	0 R	12 MS	40 SS
<i>L. plantarum</i> 304MRS3	26 SS	0 R	45 SS	38 SS	32 SS	12 MS	0 R	14 MS	38 SS
<i>L. plantarum</i> 306TOS2	28 SS	0 R	40 SS	34 SS	34 SS	10 MS	0 R	14 MS	36 SS
<i>Lactobacillus sp.</i> (Група I) 308MRS4	28 SS	0 R	40 SS	32 SS	34 SS	12 MS	0 R	15 MS	32 SS
<i>Lactobacillus sp.</i> (Група I) 603MRS1	22 S	0 R	32 SS	24 S	24 S	10 MS	0 R	12 MS	28 SS
<i>Lactobacillus sp.</i> (Група I) 603MRS2	24 S	0 R	28 SS	26 SS	25 S	10 MS	0 R	14 MS	25 S
<i>Lactobacillus sp.</i> (Група I) 605MRS6	24 S	0 R	30 SS	25 S	24 S	10 MS	0 R	14 MS	24 S

Легенда: R – Резистентен (липсва инхибиторна зона);  
MS – Умерено чувствителен (инхибиторна зона до 16 mm);  
S – Чувствителен (инхибиторна зона между 16 и 25 mm);  
SS – Силно чувствителен (инхибиторна зона над 25 mm).

## Оценка на пробиотичния потенциал на новоизолирани щамове млечнокисели бактерии

### 1. Подкисляваща способност (Hwanhlem *et al.*, 2011)

Подкисляващата способност на изследваната група щамове е изразена като разлика в киселинността на културалната среда на всеки щам ( $\Delta$  рН) между нулевия момент на посяване и след 24-часовото развитие на щама. В нулевия момент рН стойностите варират между щамовете в диапазона 5.82 – 5.97. Резултатите за  $\Delta$  рН за всеки щам са представени на Фигура 5.



**Фигура 5:** Подкисляване на средата,  $\Delta$  рН (Hwanhlem *et al.*, 2011)

Получените стойности за  $\Delta$ рН варират между 2.05 и 1.35. Най-високи резултати са регистрирани за щамовете, изолирани от ферментиралите зеленчукови храни. Прави впечатление, че щамовете *Lactiplantibacillus plantarum*, изолирани от кърма, проявяват значително по-висока подкисляваща способност, в сравнение със щамовете *Lacticaseibacillus rhamnosus* от същата група проби ( $\Delta$ рН 1.91 за *L. plantarum* 011BB3 в сравнение с  $\Delta$ рН 1.35 за *L. rhamnosus* 009M173).

### 2. Продукция на водороден пероксид (Malnado *et. al.*, 2012)

Способността за продукция на  $H_2O_2$  на изследваните щамове е определена чрез прилагането на полуколичествен метод, включващ култивиране в хранителна среда с добавени пероксидаза и тетраметилбензидин. При развитието на пероксид-продуциращ

щам в тази среда пероксидазата генерира O<sub>2</sub> от продуцирания H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, а в негово присъствие тетраметилбензидина оцветява колонии в синьо. В зависимост от интензитета на синьото пигментиране на култивираните колонии приложеният метод позволява полуколичествена оценка на пероксид-продуциращите възможности на изследваните щамове. Наблюдаваните културални картини и отнасянето им към съответния резултат е илюстрирано на Фигура 6, а получените резултати за цялата група изследвани щамове са представени в Таблица 13.



**Фигура 6:** Културална картина при изследване на продукцията на водороден пероксид (Maldonado et. al., 2012)

**Таблица 13а:** Продукция на водороден пероксид (Maldonado et. al., 2012)

Произход	Щам	Резултат
Кърма	<i>L. rhamnosus</i> 001TOS	+
	<i>L. delbrueckii</i> 001TOS1	+
	<i>L. rhamnosus</i> 003MRS	+
	<i>L. rhamnosus</i> 003TOS	++
	<i>L. rhamnosus</i> 003M17	+
	<i>L. rhamnosus</i> 004MRS	+
	<i>L. rhamnosus</i> 004TOS	+
	<i>L. rhamnosus</i> 007MRS5	+
	<i>L. rhamnosus</i> 009TOS2	+
	<i>L. rhamnosus</i> 009M173	++
	<i>L. paracasei</i> 010TOS1	+
	<i>Lactobacillus</i> sp. 010TOS2	+
	<i>L. plantarum</i> 010TOS3	+++
	<i>L. plantarum</i> 010M174	+++
	<i>L. plantarum</i> 011BB3	+

**Легенда:** (+) отрицателен резултат – типичен растеж без синьо пигментиране на колонии;  
 (++) слабо позитивен резултат – умерено синьо пигментиране на колонии;  
 (+++) силно позитивен резултат – интензивно синьо пигментиране на колонии.





Таблица 136: Продукция на водороден пероксид (Maldonado et. al., 2012)

Произход	Щам	Резултат
Ферментирани зеленчукови храни	<i>L. plantarum</i> 300TOS1	++
	<i>L. plantarum</i> 301TOS3	++
	<i>L. plantarum</i> 302MRS4	+++
	<i>L. plantarum</i> 303MRS1	+++
	<i>L. plantarum</i> 304MRS3	+++
	<i>L. plantarum</i> 306TOS2	+++
	<i>Lactobacillus</i> sp. (Група I) 308MRS4	+
Сурово-сушени меса	<i>Lactobacillus</i> sp. (Група I) 603MRS1	+
	<i>Lactobacillus</i> sp. (Група I) 603MRS2	++
	<i>Lactobacillus</i> sp. (Група I) 605MRS6	++

Легенда: (+) отрицателен резултат – типичен растеж без синьо пигментиране на колонияте;  
 (++) слабо позитивен резултат – умерено синьо пигментиране на колонияте;  
 (+++) силно позитивен резултат – интензивно синьо пигментиране на колонияте.

Сред изследваните щамове като силни продуценти на  $H_2O_2$  (силно позитивен резултат, изразяващ се в наситено синьо пигментиране на колонияте) са определени шест щама (24%), а като умерени продуценти (слабо позитивен резултат, изразяващ се в умерено синьо пигментиране на колонияте) – пет щама (20%). Прави впечатление, че всички силни продуценти са щамове от вида *Lactiplantibacillus plantarum* – два изолирани от кърма (010TOS3 и 010M174) и четири изолирани от ферментирани зеленчукови храни (302MRS4, 303MRS1, 304MRS3, 306TOS2).

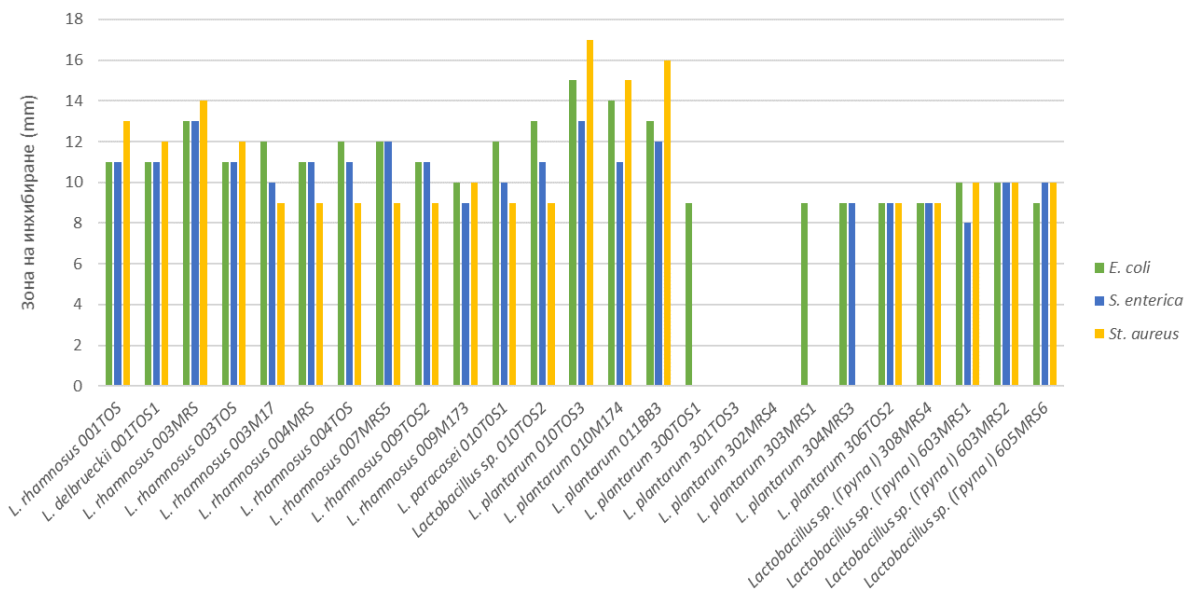
### 3. Антимикробна активност (Ivanova et. al., 1998)

Антимикробното влияние на изследваните щамове е оценено по метода на дифузия в агар срещу референтни Грам-отрицателни (*Escherichia coli* и *Salmonella enterica* serovar Typhimurium), Грам-положителни (*Staphylococcus aureus*) и дрождеви култури (*Candida albicans*). Антимикробният спектър на действие е изследван в два варианта – активност на нативни и на неутрализирани супернатанти на изследваните щамове.

Резултатите от поставения *in vitro* опит показват, че единствено нативните след ферментация супернатанти на изследваните щамове проявяват антимикробно влияние (Фигура 7). Сред тях 14 щама (56%), всички изолирани от кърма, повлияват антагонистично един или повече от изследваните тест-микроорганизми. По-изразен спектър на антимикробно влияние е отчетен към целевите Грам-отрицателни бактерии



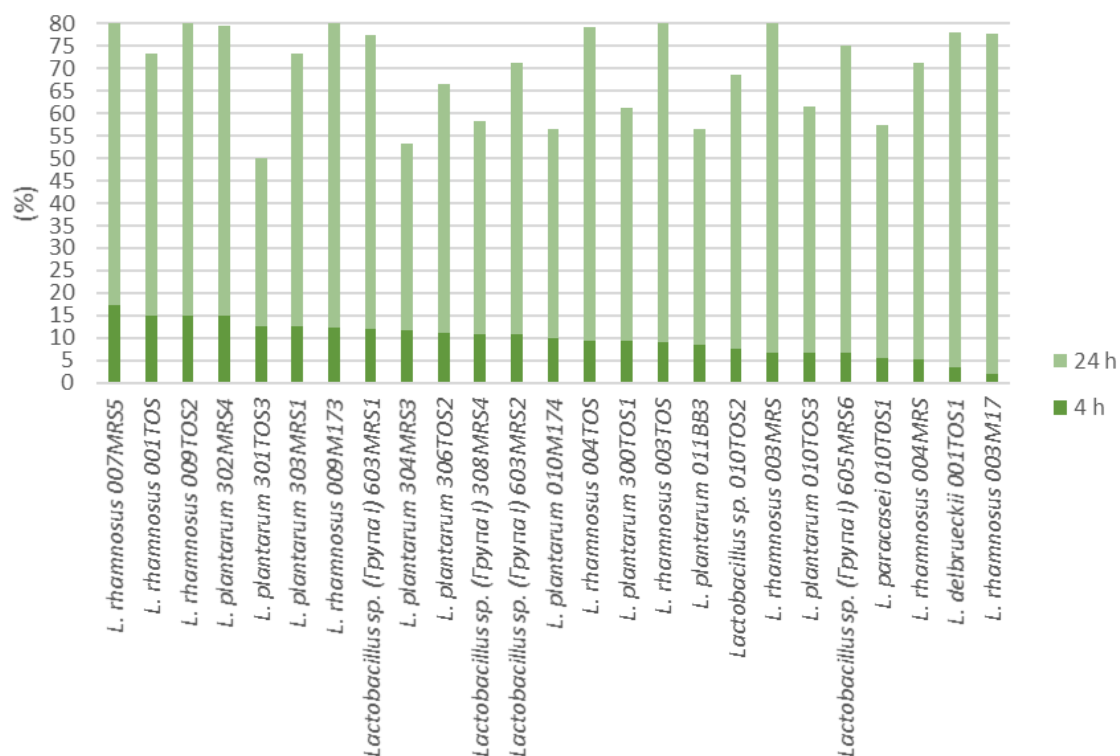
или по-конкретно: 14 щама проявяват антимикробно действие към *E. coli* (56%), 12 щама – към *S. enterica* (48%), докато към *St. aureus* – едва 4 щама (16%). Получените резултати показват, че 7 от изследваните лактобацилни щама (28%) проявяват антимикробно влияние и към трите бактериални патогена (*L. rhamnosus* 001TOS, *L. delbrueckii* 001TOS1, *L. rhamnosus* 003MRS, *L. rhamnosus* 003TOS, *L. plantarum* 010TOS3, *L. plantarum* 010M174 и *L. plantarum* 011BB3). Сред тях се отличават щамовете *Lactiplantibacillus plantarum* (010TOS3, 010M174 и 011BB3), които образуват значително по-големи зони на задържане на растежа на *E. coli* и *St. aureus*.



**Фигура 7:** Антимикробна активност на нативните след ферментация супернатанти на изследваните щамове

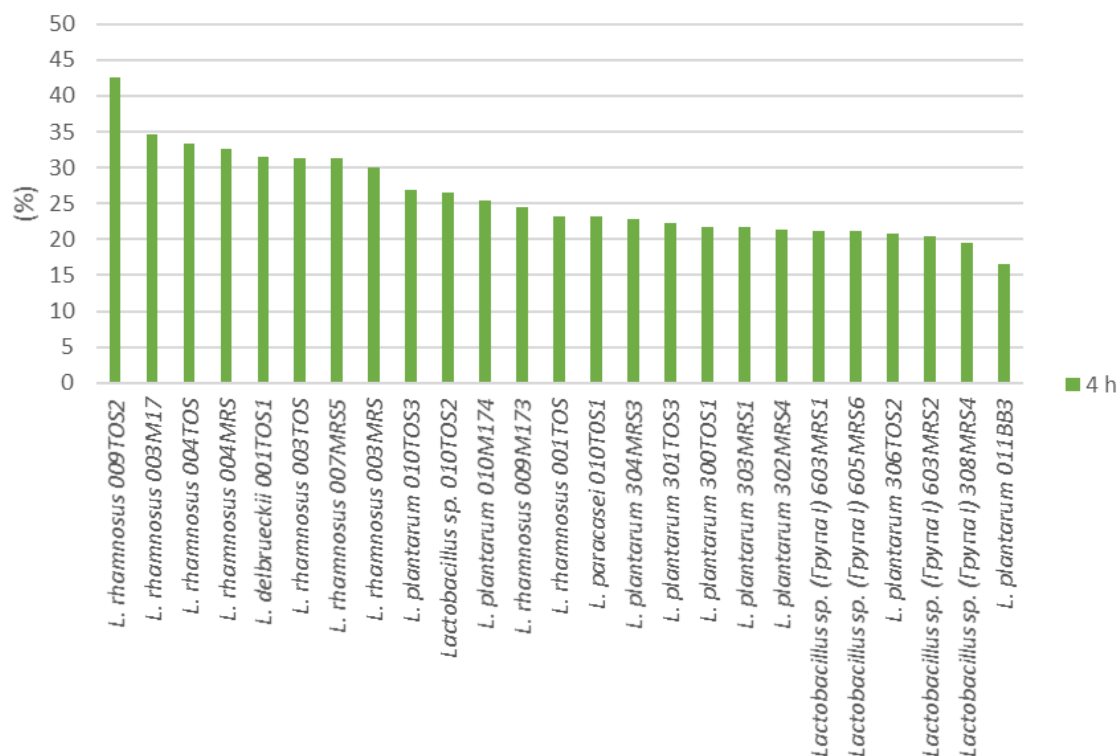
#### 4. Агрегационен фенотип (Kmet and Lucchini, 1997)

Проследяването на агрегационния фенотип на изследваните щамове включва изследване на автоагрегацията между клетки на един и същ шам и ко-агрегацията им с *S. albicans*, избрана заради възможността за отчетливи резултати, която дават по-големите размери на дрождевите клетки. Получените резултати са представени на Фигура 8 и Фигура 9.



**Фигура 8:** Автоагрегация (%) между клетки на един и същ лактобацилен щам в PBS буфер (Kmet and Lucchini, 1997)

В поставения *in vitro* опит 25<sup>те</sup> изследвани щамове проявяват автоагрегационни способности на 4<sup>тия</sup> час вариращи между 1.85% и 17.24%. За 12 от изследваните щамове (48%) регистрираните резултати са над 10%, като най-изявени сред тях са щамове *L. rhamnosus* 007MRS5, *L. rhamnosus* 001TOS, *L. rhamnosus* 009TOS2 и *L. plantarum* 302MRS4. В 24<sup>тия</sup> час на изпитването стойностите на автоагрегация са значително по-високи (варират между 82.46% и 37.50%), но няма изявена корелация между регистрираните резултати в 4<sup>тия</sup> и 24<sup>тия</sup> час за един и същ щам. Допускаме, че доброто избистряне на клетъчните субстанции в 24<sup>тия</sup> час се дължи по-скоро на физичния процес на утаяване на клетките, отколкото на биохимичното свързване между тях, което протича в първите часове на изпитването. Това ни дава основание в последващото интерпретиране на резултатите, охарактеризиращи бариерните механизми на изследваните щамове, да включим само стойностите на автоагрегация, получени в 4<sup>тия</sup> час от изпитването.



**Фигура 9:** Ко-агрегация (%) на лактобацилен щам с *C. albicans* в PBS буфер (Kmet and Lucchini, 1997)

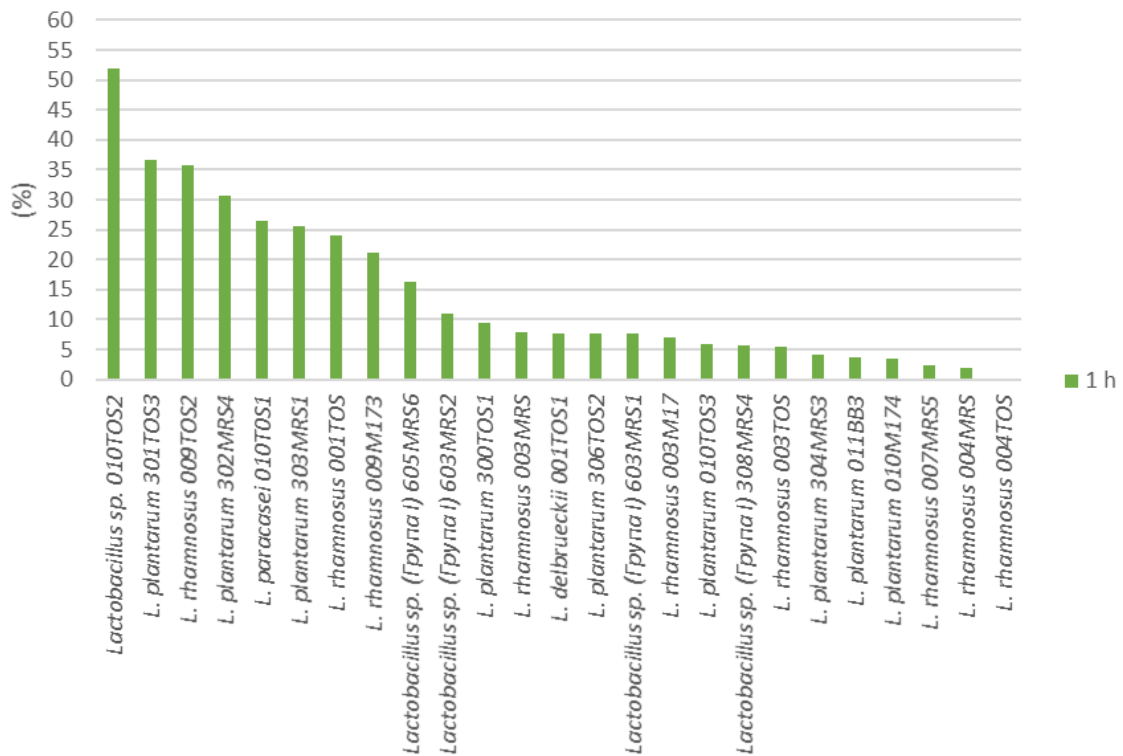
При определяне на ко-агрегационните възможности на изследваните лактобацилни щамове към *C. albicans* в 4<sup>тия</sup> час от изпитването са отчетени стойности, вариращи между 42.55% и 16.5%. Осем от изследваните щамове (32%) проявяват ко-агрегационни възможности над 30% в съответния период на изпитване – *L. rhamnosus* 009TOS2, *L. rhamnosus* 003M17, *L. rhamnosus* 004TOS, *L. rhamnosus* 004MRS, *L. delbrueckii* 001TOS1, *L. rhamnosus* 003TOS, *L. rhamnosus* 007MRS5 и *L. rhamnosus* 003MRS. В 24<sup>тия</sup> час от изпитването клетъчните суспензии, включително контролната суспензия на *C. albicans* са напълно избистрени и подобно на изпитването на автоагрегационните възможности – тези резултати не са включени при интерпретиране на бариерните механизми на изследваните щамове.

Агрегационния фенотип на два от изследните щамове *L. rhamnosus* 009TOS2 и *L. rhamnosus* 007MRS5 се проявява във високи автоагрегационни (съответно 14.81% и 17.24%) и коагрегационни възможности (съответно 42.55% и 31.25%), което ги определя като най-перспективни по изследвания показател. Интересно е агрегационното поведение на *L. rhamnosus* 003M17, който съвместява най-ниската автоагрегация (1.85%) и една от най-високите ко-агрегации (34.65%).



## 5. Повърхностна характеристика – хидрофобност (Schar-Zammaretti *et. al.*, 2003)

Оценката на хидрофобността на изследваните щамове отрази предпочитаната локализация на клетките им, поставени във водна фаза и в такава на неполярен разтворител (хексадекан). Количествено резултатите са изразени като процент адхезия към неполярен разтворител и са представени на Фигура 10.



**Фигура 10:** Хидрофобност (%) на изследваните лактобацилни щамове (Schar-Zammaretti *et. al.*, 2003)

Резултатите от поставения *in vitro* опит варират между 51.92% и 1.96%, а за един от щамове не е регистрирана хидрофобност (*L. rhamnosus* 004TOS). Девет от изследваните щамове (36%) проявяват хидрофобност над 15%. За шест от тях са регистрирани едни от най-добрите резултати от изпитване на автоагрегацията – *L. plantarum* 301TOS3, *L. rhamnosus* 009TOS2, *L. plantarum* 302MRS4, *L. plantarum* 303MRS1, *L. rhamnosus* 001TOS и *L. rhamnosus* 009M173. Предвид това, за тези шест щама основателно може да се предложи, че притежават добри адхезионни възможности. Трябва да се отбележи, че очертаният профил на хидрофобност на изследваната група щамове не корелира в своята цялост с проявените автоагрегационни възможности.



## 6. Продукция на екзополisahариди (Paulo *et al.*, 2012)

Способността на изследваните щамове да продуцират екзополisahариди е оценена чрез култивиране в модифицирана хранителна среда с доминиращ въглехидратен източник захароза (30%) и оценка на културалната картина, изразяваща се в образуването на слузести колонии от щамовете, продуциращи екзополisahариди. Въпреки известния субективизъм при отчитане на резултатите от това изпитване, можем да заключим, че търсената културална картина се наблюдава при седем от изследваните щамове (28%), които са определени като умерени продуценти на екзополisahариди – *L. rhamnosus*. 003M17, *L. plantarum* 010M174, *L. plantarum* 011BB3, *L. plantarum* 301TOS3, *L. plantarum* 302MRS4, *L. plantarum* 303MRS1 и *Lactobacillus* sp. (Група I) 603MRS1.

## 7. Формиране на биофилм (Gomez *et al.*, 2016)

Оценката на биофилмформиращите възможности на изследваните щамове е отнесена към наблюденията над възможностите им да продуцират екзополisahариди. Очаквано е регистрирана корелация между тези физиологично свързани свойства – седем от изследваните щамове (28%) са определени като умерени производители на биофилм и при всички тях е регистрирана продукция на екзополisahариди в предходното изпитване. Получените резултати са представени в Таблица 14.

**Таблица 14а: Формиране на биофилм (Gomez *et al.*, 2016)**

Произход	Щам	Оптическа плътност, OD (540 nm)				Заключение
		Повторение 1	Повторение 2	Повторение 3	Средно	
Кърма	<i>L. rhamnosus</i> 001TOS	0,04	0,034	0,031	0,035	Слаб производител
	<i>L. delbrueckii</i> 001TOS1	0,045	0,044	0,05	0,046	Слаб производител
	<i>L. rhamnosus</i> 003MRS	0,051	0,041	0,072	0,055	Слаб производител
	<i>L. rhamnosus</i> 003TOS	0,098	0,053	0,053	0,068	Слаб производител
	<i>L. rhamnosus</i> . 003M17	0,384	0,439	0,441	0,421	Умерен производител
	<i>L. rhamnosus</i> 004MRS	0,143	0,081	0,099	0,108	Слаб производител
	<i>L. rhamnosus</i> 004TOS	0,097	0,131	0,117	0,115	Слаб производител
	<i>L. rhamnosus</i> 007MRS5	0,085	0,107	0,323	0,172	Слаб производител
	<i>L. rhamnosus</i> 009TOS2	0,348	0,168	0,113	0,210	Слаб производител
	<i>L. rhamnosus</i> 009M173	0,116	0,126	0,108	0,117	Слаб производител

**Легенда:** Слаб производител на биофилм:  $OD_k < OD \leq 2 \times OD_k$ .  
 Умерен производител на биофилм:  $2 \times OD_k < OD \leq 4 \times OD_k$ .  
 Производител на биофилм:  $OD > 4 \times OD_k$ .  
 НП – Не е приложимо.

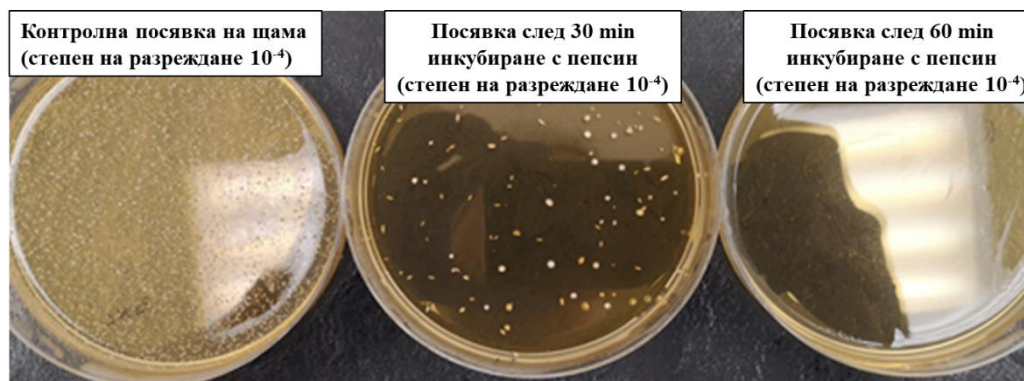
Таблица 146: Формиране на биофилм (Gomez et al., 2016)

Произход	Щам	Оптическа плътност, OD (540 nm)				Заклучение
		Повторение 1	Повторение 2	Повторение 3	Средно	
Кърма	<i>L. paracasei</i> 010TOS1	0,107	0,097	0,148	0,117	Слаб производител
	<i>Lactobacillus</i> sp. 010TOS2	0,083	0,104	0,096	0,094	Слаб производител
	<i>L. plantarum</i> 010TOS3	0,123	0,148	0,398	0,223	Слаб производител
	<i>L. plantarum</i> 010M174	0,56	0,403	0,262	0,408	Умерен производител
	<i>L. plantarum</i> 011BB3	0,374	0,265	0,188	0,276	Умерен производител
Ферментирани зеленчукови храни	<i>L. plantarum</i> 300TOS1	0,189	0,167	0,198	0,185	Слаб производител
	<i>L. plantarum</i> 301TOS3	0,309	0,270	0,222	0,267	Умерен производител
	<i>L. plantarum</i> 302MRS4	0,405	0,350	0,321	0,359	Умерен производител
	<i>L. plantarum</i> 303MRS1	0,302	0,280	0,332	0,305	Умерен производител
	<i>L. plantarum</i> 304MRS3	0,201	0,198	0,199	0,199	Слаб производител
	<i>L. plantarum</i> 306TOS2	0,150	0,123	0,145	0,139	Слаб производител
	<i>Lactobacillus</i> sp. (Група I) 308MRS4	0,129	0,111	0,145	0,128	Слаб производител
Сурово-сушени меса	<i>Lactobacillus</i> sp. (Група I) 603MRS1	0,240	0,306	0,287	0,278	Умерен производител
	<i>Lactobacillus</i> sp. (Група I) 603MRS2	0,145	0,112	0,117	0,125	Слаб производител
	<i>Lactobacillus</i> sp. (Група I) 605MRS6	0,120	0,110	0,127	0,119	Слаб производител
Контрола		0,119	0,119	0,119	0,119	НП

Легенда: Слаб производител на биофилм:  $OD_k < OD \leq 2 \times OD_k$   
 Умерен производител на биофилм:  $2 \times OD_k < OD \leq 4 \times OD_k$   
 Производител на биофилм:  $OD > 4 \times OD_k$   
 НП – Не е приложимо.

### 8. Толерантност към пепсин и панкреатин (Charteris et al., 1998)

Оценена е транзитната толерантност на изследваните щамове към действието на 0.3% разтвор на пепсин, рН 2.0 и 0.1% разтвор на панкреатин, рН 8.0. Получените резултати са представени в Таблица 15, Фигура 12 и Фигура 13. Пример на наблюдаваните културални картини е илюстриран на Фигура 11.



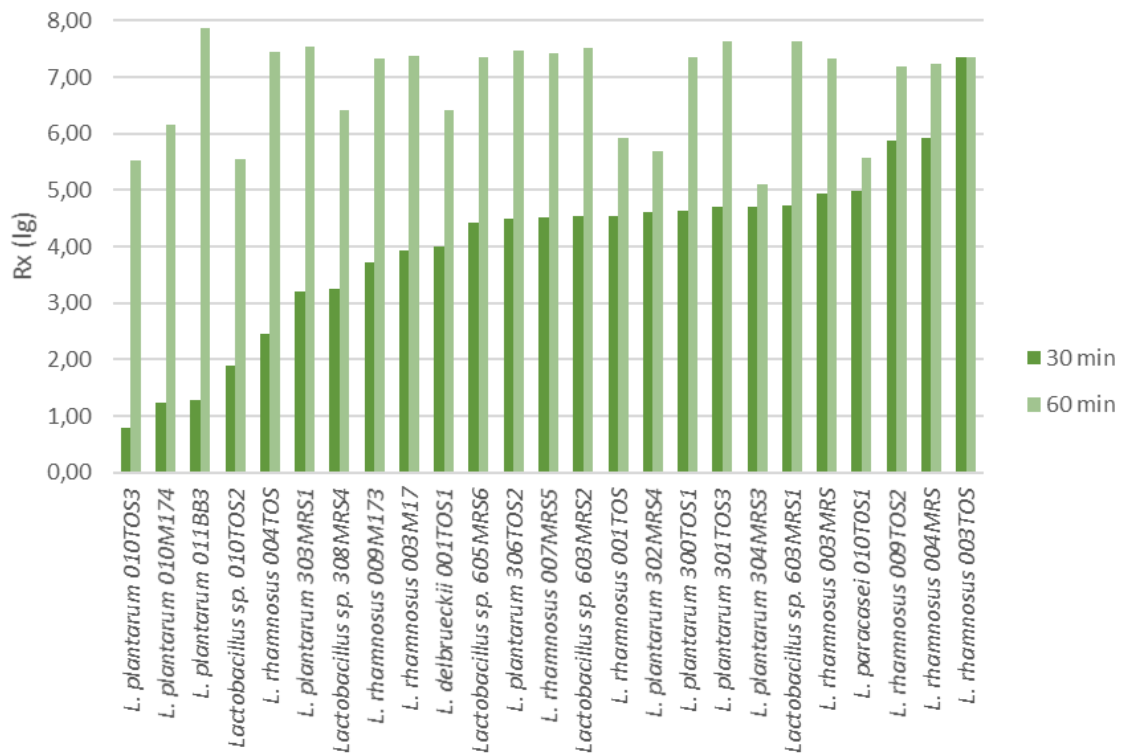
Фигура 11: Толерантност на *Lactiplantibacillus plantarum* 011BB3 към пепсин (Charteris et al., 1998)



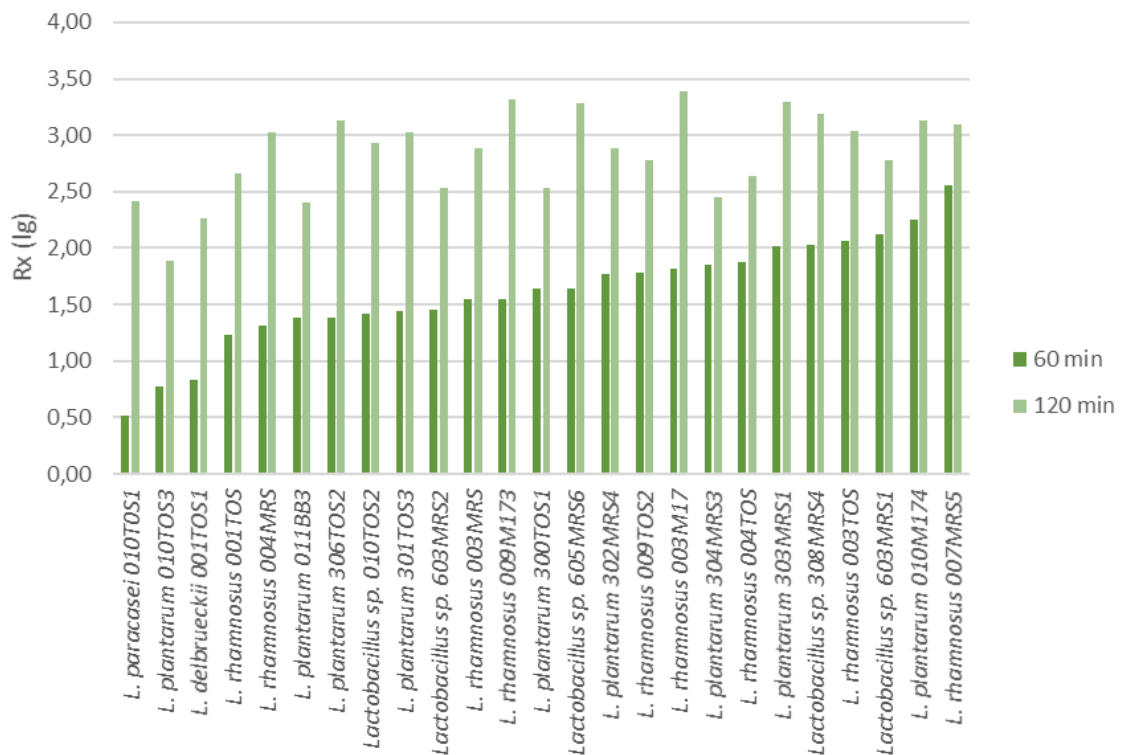
Таблица 15: Толерантност към пепсин и панкреатин (Charteris et al., 1998)

Произход	Щам	Пепсин, рН 2.0				Панкреатин, рН 8.0		
		Контрола (CFU/mL)	Резултат Брой микроорганизми (CFU/mL) / Степен на редукция (R <sub>x</sub> )			Контрола (CFU/mL)	Резултат Брой микроорганизми (CFU/mL) / Степен на редукция, R <sub>x</sub> (lg)	
			30 min	60 min	90 min		60 min	120 min
Кърма	<i>L. rhamnosus</i> 001TOS	2.5x10 <sup>7</sup>	7.2 x 10 <sup>2</sup> / 4.54	3 x 10 <sup>1</sup> / 5.92	< 1 / 7.40	5.5x10 <sup>7</sup>	3.2 x 10 <sup>6</sup> / 1.23	1.2 x 10 <sup>5</sup> / 2.66
	<i>L. delbrueckii</i> 001TOS1	2.6x10 <sup>7</sup>	2.7 x 10 <sup>3</sup> / 3.99	1 x 10 <sup>1</sup> / 6.42	< 1 / 7.42	3.5x10 <sup>7</sup>	5.1 x 10 <sup>6</sup> / 0.83	1.9 x 10 <sup>5</sup> / 2.26
	<i>L. rhamnosus</i> 003MRS	2.2x10 <sup>7</sup>	2.5 x 10 <sup>2</sup> / 4.94	< 1 / 7.34	< 1 / 7.34	2.5x10 <sup>7</sup>	7.1 x 10 <sup>5</sup> / 1.55	3.2 x 10 <sup>4</sup> / 2.89
	<i>L. rhamnosus</i> 003TOS	2.3x10 <sup>7</sup>	< 1 / 7.36	< 1 / 7.36	< 1 / 7.36	2.2x10 <sup>7</sup>	1.9 x 10 <sup>5</sup> / 2.06	2.0 x 10 <sup>4</sup> / 3.04
	<i>L. rhamnosus</i> 003M17	2.4x10 <sup>7</sup>	2.9 x 10 <sup>3</sup> / 3.92	< 1 / 7.38	< 1 / 7.38	2.7x10 <sup>7</sup>	4.1 x 10 <sup>5</sup> / 1.82	1.1 x 10 <sup>4</sup> / 3.39
	<i>L. rhamnosus</i> 004MRS	1.7x10 <sup>7</sup>	2 x 10 <sup>1</sup> / 5.93	< 1 / 7.23	< 1 / 7.23	1.9x10 <sup>7</sup>	9.3 x 10 <sup>5</sup> / 1.31	1.8 x 10 <sup>4</sup> / 3.02
	<i>L. rhamnosus</i> 004TOS	2.8x10 <sup>7</sup>	9.7x10 <sup>4</sup> / 2.46	< 1 / 7.45	< 1 / 7.45	3.1x10 <sup>7</sup>	8.1 x 10 <sup>5</sup> / 1.88	7.0 x 10 <sup>4</sup> / 2.64
	<i>L. rhamnosus</i> 007MRS5	2.7x10 <sup>7</sup>	8.2 x 10 <sup>2</sup> / 4.52	< 1 / 7.43	< 1 / 7.43	4.0x10 <sup>7</sup>	1.1 x 10 <sup>5</sup> / 2.56	3.2 x 10 <sup>4</sup> / 3.09
	<i>L. rhamnosus</i> 009TOS2	1.5x10 <sup>7</sup>	2 x 10 <sup>1</sup> / 5.88	< 1 / 7.18	< 1 / 7.18	3.1x10 <sup>7</sup>	5.1 x 10 <sup>5</sup> / 1.78	5.1 x 10 <sup>4</sup> / 2.78
	<i>L. rhamnosus</i> 009M173	2.2x10 <sup>7</sup>	4.1 x 10 <sup>3</sup> / 3.73	< 1 / 7.34	< 1 / 7.34	2.5x10 <sup>7</sup>	7.1 x 10 <sup>5</sup> / 1.55	1.2 x 10 <sup>4</sup> / 3.32
	<i>L. paracasei</i> 010TOS1	2.3x10 <sup>7</sup>	2.4 x 10 <sup>2</sup> / 4.98	6 x 10 <sup>1</sup> / 5.58	< 1 / 7.36	2.6x10 <sup>7</sup>	8.0 x 10 <sup>6</sup> / 0.52	1.0 x 10 <sup>5</sup> / 2.42
	<i>Lactobacillus</i> sp. 010TOS2	3.2x10 <sup>7</sup>	4.1 x 10 <sup>5</sup> / 1.90	9 x 10 <sup>1</sup> / 5.56	< 1 / 7.51	2.4x10 <sup>7</sup>	9.2 x 10 <sup>5</sup> / 1.42	2.8 x 10 <sup>4</sup> / 2.93
	<i>L. plantarum</i> 010TOS3	6.8x10 <sup>7</sup>	1.1 x 10 <sup>7</sup> / 0.79	2 x 10 <sup>2</sup> / 5.53	< 1 / 7.83	2.5x10 <sup>7</sup>	4.3 x 10 <sup>6</sup> / 0.77	3.2 x 10 <sup>5</sup> / 1.89
	<i>L. plantarum</i> 010M174	7.1x10 <sup>7</sup>	4.1 x 10 <sup>6</sup> / 1.24	5 x 10 <sup>1</sup> / 6.15	< 1 / 7.85	5.0x10 <sup>7</sup>	2.8 x 10 <sup>5</sup> / 2.25	3.7 x 10 <sup>4</sup> / 3.13
	<i>L. plantarum</i> 011BB3	7.3x10 <sup>7</sup>	3.8 x 10 <sup>6</sup> / 1.28	< 1 / 7.86	< 1 / 7.86	1.7x10 <sup>7</sup>	7.1 x 10 <sup>5</sup> / 1.38	6.8 x 10 <sup>4</sup> / 2.40
Ферментирали зеленчукови храни	<i>L. plantarum</i> 300TOS1	2.3x10 <sup>7</sup>	5.2 x 10 <sup>2</sup> / 4.64	< 1 / 7.36	< 1 / 7.36	3.1x10 <sup>7</sup>	7.1 x 10 <sup>5</sup> / 1.64	9.1 x 10 <sup>4</sup> / 2.53
	<i>L. plantarum</i> 301TOS3	4.3x10 <sup>7</sup>	9.2 x 10 <sup>2</sup> / 4.70	< 1 / 7.63	< 1 / 7.63	2.7x10 <sup>7</sup>	9.9 x 10 <sup>5</sup> / 1.44	2.5 x 10 <sup>4</sup> / 3.03
	<i>L. plantarum</i> 302MRS4	2.9x10 <sup>7</sup>	7.9 x 10 <sup>2</sup> / 4.60	6 x 10 <sup>1</sup> / 5.68	< 1 / 7.46	2.5x10 <sup>7</sup>	4.3 x 10 <sup>5</sup> / 1.77	3.2 x 10 <sup>4</sup> / 2.89
	<i>L. plantarum</i> 303MRS1	3.5x10 <sup>7</sup>	2.2. x 10 <sup>4</sup> / 3.20	< 1 / 7.54	< 1 / 7.54	2.2x10 <sup>7</sup>	2.1 x 10 <sup>5</sup> / 2.02	1.1 x 10 <sup>4</sup> / 3.30
	<i>L. plantarum</i> 304MRS3	4.1x10 <sup>7</sup>	8.1 x 10 <sup>2</sup> / 4.70	3.2 x 10 <sup>1</sup> / 5.10	< 1 / 7.61	2.5x10 <sup>7</sup>	7.6 x 10 <sup>5</sup> / 1.85	9.0 x 10 <sup>4</sup> / 2.45
	<i>L. plantarum</i> 306TOS2	2.9x10 <sup>7</sup>	9.2 x 10 <sup>2</sup> / 4.50	< 1 / 7.46	< 1 / 7.46	1.9x10 <sup>7</sup>	8.0 x 10 <sup>5</sup> / 1.38	1.4 x 10 <sup>4</sup> / 3.13
	<i>Lactobacillus</i> sp. 308MRS4	5.2x10 <sup>7</sup>	3.0 x 10 <sup>4</sup> / 3.24	2 x 10 <sup>1</sup> / 6.42	< 1 / 7.72	6.0x10 <sup>7</sup>	5.6 x 10 <sup>5</sup> / 2.03	3.9 x 10 <sup>4</sup> / 3.19
Сурово-сушени меса	<i>Lactobacillus</i> sp. 603MRS1	4.2x10 <sup>7</sup>	8.2 x 10 <sup>2</sup> / 4.72	< 1 / 7.63	< 1 / 7.63	2.5x10 <sup>7</sup>	1.9 x 10 <sup>5</sup> / 2.12	4.2 x 10 <sup>4</sup> / 2.78
	<i>Lactobacillus</i> sp. 603MRS2	3.3x10 <sup>7</sup>	9.8 x 10 <sup>2</sup> / 4.53	< 1 / 7.52	< 1 / 7.52	2.4x10 <sup>7</sup>	8.4 x 10 <sup>5</sup> / 1.46	7.1 x 10 <sup>4</sup> / 2.53
	<i>Lactobacillus</i> sp. 605MRS6	2.3x10 <sup>7</sup>	8.7 x 10 <sup>2</sup> / 4.42	< 1 / 7.36	< 1 / 7.36	2.1x10 <sup>7</sup>	4.8 x 10 <sup>5</sup> / 1.64	1.1 x 10 <sup>4</sup> / 3.28





Фигура 12: Толерантност към пепсин, изразена чрез степента на редукция (lg) на жизнеспособните клетки (Charteris et al., 1998)



Фигура 13: Толерантност към панкреатин, изразена чрез степента на редукция (lg) на жизнеспособните клетки (Charteris et al., 1998)



Степента на редукция на щамовете при 30-минутно присъствие на пепсин варира в широки граници – между 0.79 lg и 7.36 lg. Най-добри резултати са регистрирани за *L. plantarum* 010TOS3, *L. plantarum* 010M174, *L. plantarum* 011BB3, *Lactobacillus* sp. 010TOS2 и *L. rhamnosus* 004TOS. Степента на редукция на изброените щамове е по-малка от 3.0 lg (по-малка от три порядъка), като най-добри резултати са регистрирани за първите три щамове (степен на редукция по-малко от 1.5 lg). При по-дълъг период на инкубация (60 и повече минути) в присъствието на пепсин жизнеспособността на клетките на изследваните щамове спада драстично (степен на редукция по-голяма от 5.00 lg), което ясно показва нетолерантността им към по-дългото присъствие на ензима.

Очаквано изследваните щамове проявиха по-висока толерантност към панкреатина. При 60-минутна инкубация в негово присъствие регистрираната степен на редукция между щамовете ваира от 0.52 lg до 2.56 lg. Редукция под 1.0 lg (един порядък) в този времеви период е регистрирана за три от изследваните щамове – *L. paracasei* 010TOS1, *L. plantarum* 010TOS3 и *L. delbrueckii* 001TOS1, като един от тях е проявил и най-изявена толерантност към пепсин (*L. plantarum* 010TOS3). В следствие на 120-минутно инкубиране на изследваните щамове в присъствието на панкреатин жизнеспособността на клетките им се редуцира с два-три порядъка (степен на редукция между 1.89 lg и 3.39 lg).

## 9. Усвояване на пребиотик (Mandadzhieva *et al.*, 2014)

Оценени са възможностите на изследваните лактобацилни щамове да метаболизират един от най-често предлаганите пребиотици – инулин (полизахарид с растителен произход). Приложен е полуколичествен метод, при който изследваните щамове са култивирани в среда, съдържаща инулин като единствен въглехидратен източник и индикаторно багрило бромкрезол пурпур. Способността за усвояване на инулин от съответния лактобацилен щам корелира с възможността му да се развива в такава среда и води до понижаване на рН на културалната среда. Това се визуализира от индикаторното багрило като промяна на цвета на средата – от лилав цвят при липса на усвояване инулина (рН > 6.5), през зелено-оранжев цвят при частично усвояване на инулина до жълт при пълно усвояване на инулина (рН < 5.0). Получените резултати от проведения опит са представени в Таблица 16.

Всички 25 щамове усвояват инулина в различна степен, като 16 от тях (64%) метаболизират напълно изследвания пребиотик – *L. rhamnosus* 001TOS, *L. delbrueckii*



001TOS1, *L. rhamnosus* 003MRS, *L. rhamnosus* 003TOS, *L. rhamnosus* 007MRS5, *L. paracasei* 010TOS1, *Lactobacillus* sp. 010TOS2, *L. plantarum* 010TOS3, *L. plantarum* 010M174, *L. plantarum* 011BB3, *L. plantarum* 300TOS1, *L. plantarum* 301TOS3, *L. plantarum* 302MRS4, *L. plantarum* 303MRS1 и *Lactobacillus* sp. (Група I) 308MRS4.

**Таблица 16:** Усвояване на пребиотик инулин (Mandadzhieva et al., 2014)

Произход	Щам	Резултат на 24 <sup>тия</sup> час	Резултат на 48 <sup>тия</sup> час
Кърма	<i>L. rhamnosus</i> 001TOS	Пълно усвояване	Пълно усвояване
	<i>L. delbrueckii</i> 001TOS1	Пълно усвояване	Пълно усвояване
	<i>L. rhamnosus</i> 003MRS	Пълно усвояване	Пълно усвояване
	<i>L. rhamnosus</i> 003TOS	Пълно усвояване	Пълно усвояване
	<i>L. rhamnosus</i> 003M17	Частично усвояване	Частично усвояване
	<i>L. rhamnosus</i> 004MRS	Частично усвояване	Частично усвояване
	<i>L. rhamnosus</i> 004TOS	Частично усвояване	Частично усвояване
	<i>L. rhamnosus</i> 007MRS5	Пълно усвояване	Пълно усвояване
	<i>L. rhamnosus</i> 009TOS2	Частично усвояване	Частично усвояване
	<i>L. rhamnosus</i> 009M173	Частично усвояване	Частично усвояване
	<i>L. paracasei</i> 010TOS1	Пълно усвояване	Пълно усвояване
	<i>Lactobacillus</i> sp. 010TOS2	Пълно усвояване	Пълно усвояване
	<i>L. plantarum</i> 010TOS3	Пълно усвояване	Пълно усвояване
	<i>L. plantarum</i> 010M174	Пълно усвояване	Пълно усвояване
	<i>L. plantarum</i> 011BB3	Пълно усвояване	Пълно усвояване
Ферментирани зеленчукови храни	<i>L. plantarum</i> 300TOS1	Пълно усвояване	Пълно усвояване
	<i>L. plantarum</i> 301TOS3	Пълно усвояване	Пълно усвояване
	<i>L. plantarum</i> 302MRS4	Пълно усвояване	Пълно усвояване
	<i>L. plantarum</i> 303MRS1	Пълно усвояване	Пълно усвояване
	<i>L. plantarum</i> 304MRS3	Частично усвояване	Частично усвояване
	<i>L. plantarum</i> 306TOS2	Частично усвояване	Частично усвояване
	<i>Lactobacillus</i> sp. (Група I) 308MRS4	Пълно усвояване	Пълно усвояване
Сурово-сушени меса	<i>Lactobacillus</i> sp. (Група I) 603MRS1	Частично усвояване	Частично усвояване
	<i>Lactobacillus</i> sp. (Група I) 603MRS2	Частично усвояване	Частично усвояване
	<i>Lactobacillus</i> sp. (Група I) 605MRS6	Пълно усвояване	Пълно усвояване

**Легенда:** Липса на усвояване на пребиотика - цветът на ямката се запазва лилав;  
 Частично усвояване на пребиотика - цветът на ямката се променя до зелено-оранжев;  
 Пълно усвояване на пребиотика - цветът на ямката се променя до жълт.



## Изследване на възможностите за разработване на качествен и стабилен пробиотичен продукт

### 1. Преглед и оценка на качеството на пробиотични продукти, предлагани на българския и международния пазар

Оценено е качеството на 45 проби на пробиотични продукта. Колекцията проби, включена в изследването е съставена от 17 проби на пробиотични капсули, 24 проби на пробиотични сашета и 4 проби на пробиотични таблетки (Приложение 3 от дисертационния труд).

Качеството на групата изследвани пробиотични продукти е оценено по следните два показателя – общ брой пробиотични микроорганизми и съдържание на влага в пробата. Получените резултати са обвързани с периода между времето на производство и изпитване в Таблица 17.

Получените резултати показват, че общият брой пробиотични микроорганизми в 7 от оценените проби (16%) не достига декларираната норма (за 1 проба няма обявена норма по този показател). Четири от неотговарящите проби на пробиотични капсули са опаковани в блистер, композиран от PVC фолио и алуминиево фолио. Преглед на резултатите от друг ъгъл показва, че 4 от пробите, за които са регистрирани неотговарящи резултати са изпитани след повече от 12 месеца от производството им. Получените стойности по показател съдържание на влага в изследваната група пробиотични капсули варират между 0.37% и 6.40%, като най-ниски резултати са регистрирани за пробите, опаковани в туба със сушител по стените (Проба 6 и Проба 7).

Проследяването на качеството на групата пробиотични сашета показва, че общият брой микроорганизми при 9 от оценените проби (60%) не отговаря на очакванията (за 9 от продуктите не е обявена норма по този показател). Регистрираните резултати за тази група продукти по показател съдържание на влага (където изпитването е било възможно) варират между 0.43% и 4.30%. Прави впечатление, че в четирите пробите с най-ниско съдържание на влага (< 1.0%) е отчетен висок брой жизнеспособни микроорганизми (> 4 x 10<sup>9</sup>/саше) – Проба 36, Проба 24, Проба 18 и Проба 38.

Оценката на качеството на пробиотичните продукти в таблетна дозово единица е незадоволителна – резултатите само на две от изследваните проби отговориха на декларираните норми.



Таблица 17а: Оценка на качеството на пробиотични крайни продукти

Проба от пробиотичен продукт <sup>(1)</sup>	Дозова единица	Първична опаковка	Период между производство и изпитване (месец)	Състав и норма на пробиотичните микроорганизми (≤ CFU/доз. ед.)		Резултати	
						CFU/д. ед. (CO <sup>2</sup> )	Влага (%)
Проба 1	капсула	Алуминиева туба със сушител в тапата	7	<i>L. gasseri</i> <i>L. rhamnosus</i>	1.0 x 10 <sup>8</sup>	1.5 x 10 <sup>9</sup> (0.48)	5.82
Проба 2		Блистер (PVC / алуминий)	4	<i>B. lactis</i>	1.1 x 10 <sup>10</sup>	< 10 <sup>5</sup>	6.17
Проба 3		PVC контейнер със сушител на стените	19	<i>B. lactis</i> <i>L. rhamnosus</i> <i>L. acidophilus</i>	2.0 x 10 <sup>9</sup>	9.5 x 10 <sup>9</sup> (0.63)	5.10
Проба 4		Блистер (PVC / алуминий)	23	<i>L. rhamnosus</i> <i>L. acidophilus</i> <i>L. casei</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. helveticus</i> <i>Bifidobacterium sp.</i> <i>E. faecium</i>	1.0 x 10 <sup>10</sup>	3.5 x 10 <sup>9</sup> (0.44)	НО
Проба 5		Блистер (PVC / алуминий)	24	<i>L. acidophilus</i> <i>B. lactis</i>	1.0 x 10 <sup>10</sup>	7.8 x 10 <sup>9</sup> (0.39)	НО
Проба 6 и Проба 7 (изпитани са две партии от един и същ продукт)		PVC туба със сушител на стените	2	<i>B. lactis</i>	1.0 x 10 <sup>10</sup>	3.2 x 10 <sup>10</sup> (0.58)	0.44
			15			9.5 x 10 <sup>9</sup> (0.58)	0.37
Проба 8		PVC контейнер със сушител на стените	24	<i>L. rhamnosus</i> <i>B. lactis</i>	3.0 x 10 <sup>9</sup>	1.9 x 10 <sup>9</sup> (0.69)	1.90
Проба 9		PVC контейнер с добавен сушител	3	<i>L. bulgaricus</i> <i>S. thermophilus</i> <i>L. acidophilus</i> <i>Bifidobacterium sp.</i>	6.0 x 10 <sup>9</sup>	1.1 x 10 <sup>10</sup> (0.86)	2.94
Проба 10		PVC контейнер с добавен сушител	2	<i>L. plantarum</i> <i>L. rhamnosus</i> <i>L. bulgaricus</i> <i>L. lactis</i> <i>L. helveticus</i> <i>Bifidobacterium sp.</i>	1.0 x 10 <sup>10</sup>	1.2 x 10 <sup>10</sup> (0.68)	5.00
Проба 11		PVC контейнер с добавен сушител	1	<i>L. bulgaricus</i> <i>S. thermophilus</i> <i>L. acidophilus</i> <i>Bifidobacterium sp.</i>	2.0 x 10 <sup>9</sup>	1.2 x 10 <sup>10</sup> (0.49)	2.94
Проба 12		Блистер (PVC / алуминий)	6	<i>B. lactis</i> <i>L. acidophilus</i>	1.0 x 10 <sup>9</sup>	4.9 x 10 <sup>9</sup> (0.68)	1.97
Проба 13		Блистер (PVC / алуминий)	26	<i>B. longum</i> <i>L. rhamnosus</i> <i>L. helveticus</i> <i>S. boulardii</i>	1.4 x 10 <sup>10</sup>	1.9 x 10 <sup>10</sup> (0.53)	5.83
Проба 14		PVC контейнер с добавен сушител	8	<i>B. longum</i> <i>L. acidophilus</i> <i>L. rhamnosus</i>	1.0 x 10 <sup>9</sup>	9.6 x 10 <sup>8</sup> (0.62)	6.40
Проба 15		Блистер (PVC / алуминий)	11	<i>L. acidophilus</i> <i>B. lactis</i> <i>B. bifidum</i>	1.3 x 10 <sup>10</sup>	< 10 <sup>5</sup>	4.48
Проба 16		Блистер (PVC / алуминий)	2	НИ	НИ	1.5 x 10 <sup>8</sup> (0.76)	НО
Проба 17		Алуминиев блистер	7	<i>S. boulardii</i>	5.0 x 10 <sup>9</sup>	1.3 x 10 <sup>10</sup> (0.64)	4.67

Легенда: (1) Виж Приложение 1 от дисертационния труд;

(2) CO – Стандартно отклонение;

НИ – Не е изяснено;

НО – Не е определено.



Таблица 176: Оценка на качеството на пробиотични крайни продукти

Проба от пробиотичен продукт	Дозова единица	Първична опаковка	Период между производство и изпитване (месец)	Състав и норма на пробиотичните микроорганизми ( $\leq$ CFU/доз. ед.)		Резултати	
						CFU/д. ед. (CO <sup>2</sup> )	Влага (%)
Проба 18	саше	Фолио за саше	19	<i>B. lactis</i>	5.0 x 10 <sup>9</sup>	1.4 x 10 <sup>10</sup> (0.76)	0.61
Проба 19		Фолио за саше	НИ	НИ	НИ	6.9 x 10 <sup>10</sup> (0.52)	4.10
Проба 20		Фолио за саше	9	<i>B. bifidum</i> <i>B. longum</i> <i>L. acidophilus</i> <i>E. faecium</i>	НИ	4.4 x 10 <sup>9</sup> (0.67)	3.39
Проба 21		Фолио за саше	2	НИ	НИ	< 10 <sup>7</sup>	1.99
Проба 22		Фолио за саше	9	<i>B. bifidum</i> <i>L. acidophilus</i> <i>B. longum</i> <i>E. faecium</i>	НИ	1.1 x 10 <sup>10</sup> (0.86)	3.47
Проба 23		Фолио за саше	НИ	НИ	НИ	6.5 x 10 <sup>9</sup> (0.62)	2.83
Проба 24		Фолио за саше	10	<i>Bifidobacterium sp.</i> <i>Lactobacillus sp.</i>	НИ	6.0 x 10 <sup>9</sup> (0.48)	0.50
Проба 25		Фолио за саше	24	<i>L. rhamnosus</i>	6.0 x 10 <sup>9</sup>	2.0 x 10 <sup>10</sup> (0.73)	НО
Проба 26		Фолио за саше	18	<i>L. rhamnosus</i> <i>L. helveticus</i>	4.0 x 10 <sup>9</sup>	3.0 x 10 <sup>9</sup> (0.48)	НО
Проба 27 и Проба 28 (изпитани са две партии от един и същ продукт)		Фолио за саше	13	<i>B. longum</i>	1.0 x 10 <sup>9</sup>	3.6 x 10 <sup>8</sup> (0.65)	НО
			18			3.1 x 10 <sup>8</sup> (0.47)	1.65
Проба 29		Фолио за саше	4	<i>L. paracasei</i>	1.0 x 10 <sup>9</sup>	3.3 x 10 <sup>8</sup> (0.78)	1.42
Проба 30		Фолио за саше	16	<i>B. lactis</i> <i>L. acidophilus</i>	1.1 x 10 <sup>9</sup>	1.6 x 10 <sup>9</sup> (0.95)	
Проба 31		Фолио за саше	22	<i>B. lactis</i> <i>L. acidophilus</i>	1.1 x 10 <sup>9</sup>	1.7 x 10 <sup>9</sup> (0.52)	1.47
Проба 32		Фолио за саше	18	<i>L. lactis</i> <i>B. lactis</i> <i>B. bifidum</i>	3.0 x 10 <sup>9</sup>	3.4 x 10 <sup>9</sup> (0.65)	4.30
Проба 33 и Проба 34 (изпитани са две партии от един и същ продукт)		Фолио за саше	21	<i>L. helveticus</i> <i>B. longum</i>	3.0 x 10 <sup>9</sup>	1.4 x 10 <sup>9</sup> (0.63)	НО
			8			1.7 x 10 <sup>9</sup> (0.72)	НО
Проба 35 и Проба 36 (изпитани са две партии от един и същ продукт)		Фолио за саше	28	<i>L. helveticus</i> <i>B. bifidum</i> <i>B. infantis</i>	3.0 x 10 <sup>9</sup>	2.8 x 10 <sup>9</sup> (0.53)	НО
			2			8.3 x 10 <sup>9</sup> (0.62)	0.43
Проба 37	Фолио за саше	4	<i>L. plantarum</i> <i>Pediococcus acidilactis</i> <i>L. plantarum</i>	НИ	4.9 x 10 <sup>9</sup> (0.65)	НО	
Проба 38	Фолио за саше	НИ	<i>B. lactis</i> <i>E. faecium</i> <i>L. acidophilus</i> <i>L. paracasei</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. salivarius</i> <i>L. lactis</i>	1.0 x 10 <sup>9</sup>	4.2 x 10 <sup>9</sup> (0.65)	0.96	
Проба 39	Фолио за саше	НИ	<i>Lactobacillus sp.</i> <i>Bifidobacterium sp.</i> <i>S. thermophilus</i>	НИ	< 10 <sup>7</sup>	2.10	

Легенда: (1) Виж Приложение 1 от дисертационния труд;  
(2) CO – Стандартно отклонение;  
НИ – Не е изяснено;  
НО – Не е определено.



Таблица 17в: Оценка на качеството на пробиотични крайни продукти

Проба от пробиотичен продукт	Дозова единица	Първична опаковка	Период между производство и изпитване (месец)	Състав и норма на пробиотичните микроорганизми ( $\leq$ CFU/доз. ед.)		Резултати	
						CFU/д. ед. (CO <sup>2</sup> )	Влага (%)
Проба 40	саше	Фолио за саше	3	<i>Lactobacillus sp.</i> <i>S. thermophilus</i>	НИ	$6.5 \times 10^9$ (0.52)	3.40
Проба 41		Фолио за саше	16	<i>B. lactis</i> <i>E. faecium</i> <i>L. acidophilus</i> <i>L. paracasei</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. salivarius</i> <i>L. lactis</i>	$1.0 \times 10^9$	$7.5 \times 10^9$ (0.67)	НО
Проба 42	таблетка	PVC контейнер с добавен сушител	22	<i>L. salivarius</i>	$2.5 \times 10^7$	$< 10^5$	4.59
Проба 43		Пакетче (PVC / алуминий)	НИ	НИ	НИ	$< 10^7$	1.99
Проба 44		PVC контейнер с добавен сушител	21	<i>B. lactis</i> <i>L. rhamnosus</i>	$1.0 \times 10^9$	$1.4 \times 10^9$ (0.67)	НО
Проба 45		PVC контейнер с добавен сушител	2	<i>L. bulgaricus</i> <i>L. rhamnosus</i> <i>S. thermophilus</i>	$1.0 \times 10^9$	$1.6 \times 10^9$ (0.80)	3.92

Легенда: (1) Виж Приложение 1 от дисертационния труд;

(2) CO – Стандартно отклонение;

НИ – Не е изяснено;

НО – Не е определено.

## 2. Оценка на факторите, повлияващи стабилността на пробиотичен продукт в капсула при съхранение на стайна температура

Изследвано е влиянието на група фактори (вид първична опаковка, състояние на използвания сушител, газов състав в първичната опаковка, съотношение между количество продукт и прилаган сушител и състав на различни помощни вещества) върху стабилността на пробиотични капсули. За нуждите на изследването са изготвени 30 R&D мостри на пробиотични капсули в различни вариации на състав и първична опаковка. Мострите са оценени в 4 времеви точки на контрол в рамките на една година след изготвянето им (0, 3<sup>ти</sup>, 6<sup>ти</sup> и 12<sup>ти</sup> месец) чрез преглед на резултати по четири контролни показателя (външен вид, съдържание на влага, общ брой пробиотични микроорганизми и степен на редукция) – общо 480 анализа.

Очаквано е очертана зависимост между резултатите по четирите проследени показателя при всички мостри, изразяваща се в следното – повишаването на влагата в капсулното съдържимо води до влошаване на външния му вид, намаляване на общия брой жизнеспособни пробиотични микроорганизми в капсула и респективно до увеличаване на степента им на редукция.

Направени са детайлен коментар на получените резултати и сравнителна оценка на влиянието на проследените фактори, а тяхното обобщение е сведено до следното: качеството на изследваните R&D проби на пробиотични капсули се повлиява от всички



изследвани фактори. В модела на изследването като най-успешни протектори на стабилността на пробиотичните продукти са отличени: алуминиев контейнер, лишен от влага сушител (предварително изсушен), първично опаковане в присъствието на азот, минимално количествено съотношение продукт/сушител и включване на малтодекстрин (Maltodextrin IT 19) в състава на продукта като помощно вещество.





## ИЗВОДИ

1. Количеството на млечнокисели бактерии в изследваните проби от кърма на клинично здрави български жени варира между  $< 10^1$  CFU/mL и  $1.2 \times 10^4$  CFU/mL, като се повлиява негативно от приема на антибиотици през периода на бременност/лактация и положително от приема на пробиотици.
2. Пробите от кърма, събирани посредством средства, асистирани кърменето (помпи) са най-високо бионатоварени с несвойствени екзогенни контаминанти (плесени и Грам-отрицателни бактерии).
3. От изследваните проби (11 проби кърма, 11 проби ферментирали зеленчукови храни и 5 проби сурово-сушени меса) са изолирани общо 64 изолата, които фенотипно са отнесени към групата на млечнокиселите бактерии.
4. Генотипната родова характеристика на изолатите от трите екологични ниши потвърди принадлежността на 47 от тях (73.4%) към семейство *Lactobacillaceae* и по-конкретно към родовете: *Lactiplantibacillus* (24 изолата), *Lactobacillus* (13 изолата) и *Lacticaseibacillus* (10 изолата).
5. Посредством секвенционен анализ на гена 16S рДНК е определено видовото разнообразие на новоизолираните представители на семейство *Lactobacillaceae* от кърма: *Lacticaseibacillus rhamnosus* (9 щам), *Lactiplantibacillus plantarum* (3 щам), *Lactobacillus delbrueckii* (1 щам) и *Lacticaseibacillus paracasei* (1 щам).
6. Във ферментиралите зеленчукови храни доминират представителите на вида *Lactiplantibacillus plantarum*.
7. Лактобацилите от трите екологични ниши не показват антибиотична резистентност, която да предполага хоризонтален трансфер на гени за устойчивост към антибиотици и не притежават хемолитична активност.
8. Антимикробна активност на потенциалните пробиотични щамове е установена само при нативните супернатанти, която е значително по-изразена към Грам-отрицателните тест-микроорганизми (*E. coli* и *S. enterica*), отколкото към Грам-положителния тест-микроорганизъм (*St. aureus*).



9. С най-широк спектър на антимикробно действие се отличават трите щама от вида *Lactiplantibacillus plantarum*, изолирани от кърма. Тези щамове са по-добри продуценти на биоактивни вещества като млечна киселина и водороден пероксид.
10. Изследваните лактобацили проявяват щамово-специфични агрегационни свойства. Агрегационният фенотип на два от изследваните щама (*Lacticaseibacillus rhamnosus* 007MRS5 и *Lacticaseibacillus rhamnosus* 009TOS2) съвместява високи автоагрегационни и ко-агрегационни свойства, което ги определя като потенциални пробиотични щамове.
11. Селекционирани са шест щама, които притежават добри адхезионни свойства, тъй като показват както високи стойности на автоагрегация, така и висока степен на хидрофобност.
12. Седем от изследваните щамове са определени като продуценти на екзополисахариди и умерени производители на биофилм, което предполага, че успешно могат да колонизират обитаваната среда.
13. Изследваните щамове показват вариабилна устойчивост в условия на симулиран стомашен и чревен сок. С най-добра транзитна толерантност се отличават щамовете от вида *Lactiplantibacillus plantarum*, изолирани от кърма.
14. Способност да метаболизират напълно включения в културалната им среда пребиотик притежават 16 щама, което ги определя като перспективни за успешното им комбиниране със съответния пребиотик в състава на синергичен синбиотичен продукт.
15. Оценката на качеството на 45 крайни пробиотични продукта показва, че при 18 от тях (40%) регистрираният общ брой пробиотични микроорганизми не отговаря на декларираната норма.
16. Проследяването на стабилността на R&D мостри на пробиотични капсули показва, че качеството на продукта се влияе в различна степен от всички изследвани показатели: вид първична опаковка, състояние на сушител, газов състав в първичната опаковка, количествено съотношение продукт/сушител и състав на помощните вещества. В модела на нашето изследване като най-успешни протектори на пробиотичните капсули са отличени: алуминиевият контейнер, лишен от влага сушител, първично опаковане в присъствието на азот, минимално количествено съотношение продукт/сушител и включване на малтодекстрин в състава на продукта като помощно вещество.



## ПРИНОСИ

1. За първи път е извършена микробиологична характеристика на проби от кърма от клинично здрави български жени, като получените резултати са обвързани с историята на доброволките и предполагаемите фактори повлияващи състава на млечната микробиота.
2. Настоящото изследване разширява изучаването на разнообразието на млечнокиселите бактерии в кърма на български жени, като са установени недокладвани до момента видове.
3. Извършена е характеристика на пробиотичния потенциал на млечнокисели изолати с различен произход, която дава основание за обоснована селекция на перспективни щамове и включването им в подходящо композиран пробиотичен продукт.
4. За първи път в България е проведено систематично изследване на влиянието на редица фактори, повлияващи стабилността на пробиотични продукти, като получените резултати дават ясни насоки в избора на помощни вещества и първична опаковка при композирането на краен продукт с максимално защитено качество.



## НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В ПРОЕКТИ И КОНФЕРЕНЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА

1. Marinova V., Rasheva I., Kizheva Y., Dermenzhieva Y., Hristova P., (2019). Microbiological quality of probiotic dietary supplements, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, Volume 33, 2019 - Issue 1.
2. Marinova V., Rasheva I., Kizheva Y., Dermenzhieva Y., Hristova P., (2019). Investigation of survival and viability of probiotic strains during storage, *Book 3 – Molecular Biology of the Annual of Sofia University*, 2019.
3. Изследване на ефективността и биологичния потенциал на млечнокисели бактерии, подходящи за производство на пробиотични продукти, ръководител доц. д-р Петя Христова, ФНИ на СУ, изследователски проект в подкрепа на докторанти № 80-10-119/15.04.2019.
4. Научна конференция „Климентови дни“, 5/11/2020 – постер „Evaluation of different culture media for enumeration and differentiation of *Lactobacillus* species”, Rasheva I., Kizheva Y., Dermendjieva Y., Hristova P.
5. Power of microbes in industry and environment, 15/05/2019 – 18/05/2019 – постер “Assessment of viability of probiotic cells in food supplements during long term storage”, Rasheva I., Dermenzhieva Y., Kizheva Y., Hristova P.
6. Научна конференция „Климентови дни“, 2018 – постер “Investigation of survival and viability of probiotic strains during storage”, Dermendzhieva Y., Marinova V., Rasheva I., Kizheva Y., Hristova P.