

## **РЕЦЕНЗИЯ**

на дисертационен труд на тема:

**“Свойства и характеристики на новоизолирани шамове млечнокисели бактерии и приложение в моделни пробиотични продукти за орално здраве“,**  
за придобиване на образователна и научна степен “Доктор” в област на висше образование **5. Технически науки, Професионално направление – 5.11. Биотехнологии** (ДП. Технология на биологично активните вещества)  
на редовен докторант **Никола Николов Атанасов,**  
с научен ръководител: **доц. д-р Диляна Николова**

От: **проф. Светла Данова, дбн,** Институт по микробиология „Стефан Ангелов“  
(ИМикБ), БАН

### **ОТНОСНО ПРОЦЕДУРАТА:**

Настоящата процедура по придобиване на ОНС „Доктор“ се провежда на основание чл. 4 от ЗРАСРБ, във връзка с §7 от Преходните и заключителни разпоредби на Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в СУ „Св. Кл. Охридски“, Съгласно Заповед (№ РД-38-264/31.05.2024) на Ректора на Софийски Университет „Св. Климент Охридски“ съм избрана за член на Научно жури и съм определена за рецензент на първото му заседание. В качеството ми на такава, декларирам, че не съществува конфликт на интереси по смисъла на §1, т. 2а от допълнителните разпоредби на ЗРАСРБ между мен и кандидата по процедурата за ОНС „Доктор“ и за мен не са налице ограниченията по чл.33 от ЗРАСРБ.

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

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

Човешкото здраве винаги е било във фокуса на микробиологичните изследвания, но поради динамиката, нарастващия брой и вариабилност на абиотичните и биотичните фактори, всяко ново проучване допринася за подобряване на подходите за терапия и профилактика. Докторантът правилно оценява ролята на микробиома и се насочва към изследване на полезни характеристики на група микроорганизми, които в последните години активно се изследват като ключов фактор за човешкото здраве. Акцентът в представения ми за рецензия научен труд е върху ролята на пробиотичните млечно кисели бактерии в оралния микробиом. Иновативен елемент на разработката е оценката на оралната млечно кисела микробиота, видовото разнообразие и биологична активност като фактор за здраве. Модулацията на оралния микробиом е слабо проучена и разработката предоставя нова научна информация по един нерешен проблем с архитектурата и динамиката в отделните участъци на човешкия микробиом и връзката им със здравето. Всичко това ми дава основание да оценя дисертационния труд като

изключително актуален и значим. Докторантът успешно транслира научно фундаментални към приложни изследвания, което е в унисон с най-новите научни търсения и тенденциите на пазара за здравословни продукти, изпълнявайки изискванията на научната област 5.11. *Биотехнология*.

## **ОБЕМ И СТРУКТУРА НА ДИСЕРТАЦИЯТА**

Представеният ми комплект документи и материали на хартиен и електронен носител са много добре подготвени и отговарят на всички законови изисквания за придобиване на научни степени и за заемане на академични длъжности в БФ-СУ. Дисертационният труд е написан по стандартната схема в обем от 149 стр. Спазени са изискванията за форма, съдържание и съотношение на отделните раздели както следва: *Увод* - 1 стр., *Литературен обзор* - 39 стр.; *Цел и задачи* - 2 стр.; *Материли и методи* - 13 стр., *Резултати и обсъждане* – 48 стр., *Изводи* - 2 стр., *Приноси* - 1 стр. *Използвана литература* - 26 стр.; *Приложение* – 2 стр. Прави впечатление точният научен стил и правилният граматическа издържан български език. Надлежно посочените съкращения заедно с изведените в отделни списъци с таблици и фигури улесняват четенето и оценката на дисертационния труд. Работата прави впечатление със своя логически последователен план и ясна концепция за надграждане на конкретни научни резултати като основа на приложна разработка. Дисертацията е богато илюстрирана с 24 фигури и 15 таблици. Цитирани са 466 литературни източници на английски и 1 на български, основно от последните години, което показва отлична теоретична осведоменост на докторанта.

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

Литературният обзор е добре структуриран, представя систематизирана научна информация и най-новите постижения по темата. Той е в тясна логическа обвързаност връзка с последващия раздел „Резултати и обсъждане“. В детайли са разгледани човешки орален микробиом като биотоп и биоценоза със специфични особености. Изхождайки от биоразнообразието на микроорганизми е направен паралел с микробиален баланс и дисбаланс в устната кухина и връзка между оралното и системното здраве. Систематизирано е представена информация за пробиотиците и основните групи млечно кисели бактерии, признати като такива и техните полезни функционални характеристики. Отлично впечатление прави познаването на новата таксономична класификация на МКБ и специално промените в разред *Lactobacillus*. Добрата теоретична подготвеност и познаването на най-новите открития по проблема личат не само в обзора, но и в цялостната постановка на труда. Тези знания Никола Атанасов използва включително и в последващия раздел при подбора на методични подходи. Отлично впечатление прави аналитичния подход в представянето на научна информация. Докторантът я обобщава във фигури като напр. фиг. 5 – „*Потенциални механизми на действие на пробиотиците върху оралното здраве и заболявания*“. Така по един оригинален начин той обобщава и конструира цялостна богата литературна справка, която предоставя научната база за конкретните експериментални изследвания. Литературният обзор логически води към целта и експерименталните задачи, които са формулирани ясно и точно. Целта на дисертацията е точно формулирана: „*Изоллиране*,

идентификация и характеризирание на нови щамове млечно кисели бактерии от оралната микробиота, оценка на техния пробиотичен потенциал, антимикробни активности и изследване на потенциала им за приложение в моделен пробиотичен продукт за орално здраве“. За постигането и са поставени 7 конкретни задачи и 13 подзадачи.

## ОЦЕНКА НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Докторантът е подбрал и коректно предоставил широк панел от класически и модерни молекулярни методи за изследване, в съответствие с амбициозната работна програма и множеството задачи. Личат знания и умения за подбор и представянето им. Те са в много добра логическа последователност и обвързаност. Основополагащи са микробиологичните методи, целящи създаване на контролна група изолати от микробиотата на достатъчна като брой група доброволци (16 човека без проблеми с оралното здраве); с последващ подбор на чисти култури от млечно-кисели бактерии (МКБ). Хранителните среди, условията за култивиране и морфо-физиологична характеристика са умело подбрани и представени. Високо оценявам полифазно-таксономичния панел съчетаващ класическите микробиологични методи и златния стандарт в бактериалната идентификация -16S rrr секвенционен анализ с най-новите молекулярни методи по белтъчно профилиране чрез MALDI-Tof MS система и пълно геномно секвениране. Начинът на тяхното представяне и особено по биоинформатичната обработка на цялостните геноми доказват отличното познаване на теорията и умело включване за решаване на задачите. Те са подбрани за експерименталните задачи по доказване на генетичните основи на биологичната активност на МКБ.

Потърсени са най-новите варианти за част от *in vitro* протоколите по охарактеризиране на кандидат - пробиотични микроорганизми. Оригинален е подборът на *in vitro* тестове, за оценка на преживяемостта и развитие на новоизолираните щамове МКБ при симулирани условия на различните отдели на ГИТ. Специално внимание е отделено на факторите в устната кухина, както следва: (i) преживяемост в симулирани условия на устната кухина – вкл. при орален стрес; (ii) адхезивни способности на изследваните щамове МКБ в симулирани условия; (iii) способност за свързване с муцин; (iv) способност за образуване на собствен биофилм; (v) антагонистична активност срещу тест-патогени, включително орални; (vi) *in vitro* оценка за антибиофилмова активност срещу орални тест-патогени и др.

Докторантът е избрал удобен и лесно възпроизводим метод за скрининг на антиоксидантния капацитет, като предварително протоколът е адаптиран за изследване на МКБ щамове.

Много добро впечатление прави точното и подробно описание на методите и протоколите за тяхното прилагане, което дава възможност на други изследователи също да ги прилагат в своите изследвания. Това важи и за комплекса от биотехнологични подходи за оценка на преживяемост на изследваните щамове МКБ при процес на лиофилизация и съхранение и стабилност и преживяемост в различни формулировки на моделен продукт за орално здраве. Това е още едно доказателство за теоретична и експериментална подготвеност на докторанта. На всеки етап от експерименталните

изследвания Никола Атанасов търси нови по-дискриминативни и информативни подходи и правилно прилага статистическа обработка на информацията.

## **ОЦЕНКА НА ПОЛУЧЕНИТЕ РЕЗУЛТАТИ и ПРИНОСИ**

Цялостно дисертацията представлява един обемен, много сериозен и на високо научно ниво разработен труд. Той оценява важни аспекти от видовото разнообразие и пробиотичния потенциал на млечно кисели бактерии от слабо проучения микробиом на устната кухина. Докторантът правилно се насочва към ролята на входната врата за различни микроорганизми и акцентирайки върху млечно-киселата микробиота извежда едно комплексно молекулярно-биотехнологично изследване. Събрани са достатъчен брой -76 изходни проби от устната кухина на 16 доброволци, без наличие на изразени орални заболявания. От тези проби са изолирани общо 64 изолата и са анализирани чрез класически подход за обработка. Комбинацията от хранителни среди и схемата за изолиране и видово охарактеризиране са правилни и много добре логически построени, последователно преминавайки от класическите морфо-физиологични и биохимични тестове, през генетичните и секвенционен анализ, сравнявайки ги с белтъчния идентификационен профил на MALDI Tof MS системата. Оригиналната комплексна схема за идентификация е приложена при 12 щамове, а за 8 от тях е използван най-новият таксономичен подход- пълногеномно секвениране. Не мога да не подчертая огромния обем работа по асамблирането на геномите на тези лактобацили и биоинформатичните *in silico* анализи. Докторантът показва знания и умения да осъществява не само молекулярните техники по изолиране на ДНК, PCR детекция на гени с таксономично и с биологично значение, но и биоинформатични анализи. Те не са самоцелни и по категоричен начин обосновават генетичните основи на важни пробиотични и биотехнологични свойства, при подбраната група активни щамове. Така Никола Атанасов постига не само точна видова идентификация, но разкрива и причинно-следствената връзка между функционалност и бактериален геном. Оценявам високо този подход, който спокойно може да бъде прецизиран като оригинален алгоритъм за оценка на функционалност при кандидат –пробиотични щамове, в съответствие с изискванията на ЕФСА. В тази връзка богата на подходи и статистически достоверни резултати е *in vitro* оценката на пробиотичния потенциал на подбраната група лактобацили. При тях докторантът търси паралел с екологичната ниша, от която са изолирани МКБ и функционалната им роля *in vivo*, без да пренебрегва утвърдените тестове за устойчивост към факторите на ГИТ, муцин-свързващата, адхезивната и биофилм-формиращата способност. Проведени са биоинформатични *in silico* анализи на целите геномни секвенции за наличие на генетични детерминанти за белтъци адхезини, отговорни за установените при *in vitro* анализите адхезивни характеристики на изследваните щамове. Доказани са гени за два типа адхезивни белтъци: адхезини, подпомагащи адхезията на МКБ към тъкани и други клетки и лектини, които подпомагат свързването на МКБ към въглехидрати и други белтъци. В дискусиата към тях компетентно е намерена връзка с възможия пробиотичен механизъм на тези лактобацили за превенция инвазията на патогени *in vivo*. Прецизно са изпълнени и дискутирани експериментите по преживяемостта на изследваните лактобацили в симулирани условия на устната кухина, приживяемост при орален и гастроинтестинален стрес, авто и ко агрегационна способност

и антагонистична активност. Авторът специално е подбрал група тест-патогени със значение за патологиите, не само в устната кухина. Използван е комплексен подход за установяване на антагонистичните взаимодействия на изследваните щамове, включващ антимикробна активност на безклетъчни супернатанти срещу широк спектър от Грам-положителни и Грам-отрицателни тест-патогени и срещу два орални тест-патогена (*Streptococcus mutans* и *Candida albicans*), както и адхезивни взаимодействия с тях. С допълващия *in silico* анализ на целогеномните секвенции, е показано наличие на механизми за продукция на бактериоцини при някои от изследваните щамове.

Отлично впечатление прави статистическата обработка (One-way ANOVA) на резултатите при цялата гама от тестове и оценката на взаимовръзката между установените антагонистични свойства при ко-култивиране, ко-агрегация и антибиофилмова активност получените чрез Pearson's correlation анализ.

Цялостната експерименталната постановка е правилна, даните са ясно представени и дискутирани в светлината на най-новата концепция по проблема. Така трудът успешно фокусира върху постигнатите резултати и те еднозначно могат да се сравнят с данните от литературата към днешна дата. Търсейки един нов поглед върху ролята на пробиотиците за здравето на хората е направен скрининг на антиоксидантната активност на изследваните лактобили. За целта е адаптиран оригинален агар-дифузионен метод с използване на калиев перманганат. За активните щамове, докторантът правилно отбелязва и необходимост от допълнително охарактеризиране с по-високо дискриминативните DPPH и ABTS методи.

Никола Атанасов познава проблема с превенцията на разрастването на антибиотичната резистентност и правилно оценява спектрите на антибиотична чувствителност в групата на кандидат -пробиотичните щамове. Така той изпълнява оценка по критерия за безопасност на ЕФСА, основан на антимикробната резистентност на новоизолираните МКБ.

Своеобразен комплексен характер на оценката на щамовете е постигнат с панела експерименти доказващи биотехнологично значими полезна характеристика-преживяемост при лиофилизация и съхранение. Това заедно обобщението за пробиотичния потенциал на изследваните щамове на основата на комплексната оценка от проведените анализи за спектър от функционални и пробиотични свойства е използвано с успех при избор на щамове за влагане в различни формули на моделен продукт за орално здраве. Личи търсенето на нови форми и умело съчетаване на различни тестове за *in situ* оценка. От фундаменталните научни резултати, той изгражда модели на пробиотични продукти и оценява тяхната биотехнологична релевантност в унисон с най-новите търсения на модерната биотехнология-продукти за здраве, основани на научни доказателства. Впечатление прави не само запазването на виталност на подбраните пробиотични култури, но и постигнатата безопасност в дадените нови прототипи на продукти. Резултатите от този финален раздел на работата оценявам като много перспективни за приложение.

Направените 13 извода и 5 приноса са логично следствие от цялата разработка и дават обективна информация за стойността на проведените изследвания. Малко по-кратък, по-стегнат изказ на част от изводите би допринесъл за точното им отразяване. Приемам с адмирации приносите на разработката и съм убедена, че те ще намерят реално

практическо приложение. Препоръчвам по-смело да бъдат оценявани приносите и тяхното разделяне на оригинални и такива с потвърдителен характер. Намирам приноси с методичен характер, които могат да са полезни както в научно-фундаменталните така и в приложни разработки. Безспорен и цялостен е приноса на обема от данни, които могат да подпомогнат работата на българските биотехнолози както в научно-развойната така и в приложната дейност за създаване на нови и по-добри пробиотични препарати.

## **АВТОРЕФЕРАТ, КРИТИЧНИ БЕЛЕЖКИ И ВЪПРОСИ**

Авторефератът както и цялостния дисертационен труд са оформени много добре и нямам критични бележки. Към докторанта, който с разработката доказва, че е изграден и иновативно мислещ биотехнолог“ бих поставила следния въпрос:

*„Кой продукт може успешно да бъде внедрен, защо и с какво той ще се отличава от предлаганите на пазара пробиотични продукти?“.*

За достойнствата на разработката може да се съди и по представените 3 публикации в списания с ИФ и импакт ранг реферирани в SCOPUS, на които докторантът е първи автор. Това доказва по безспорен начин неговото авторство и личен принос. Бих препоръчала, да бъде оформена публикация с данните от биоинформатичните анализи на пълно-геномното секвениране на лактобацили, изолирани от устната кухина на здрави доброволци.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

В заключение искам да подчертая, че материалът е актуален, обемен и изпълнява напълно изискванията на ЗРАСРБ и Правилниците към него. Темата е актуална, изследванията са проведени методично правилно, получените резултати са солидна база за следващи научни и приложни разработки. Изводите са естествено следствие от обемните и високонаучни изследвания. Открояват се оригинални научни и приложни приноси. Личи отличната подготвеност на докторанта, както в работата, така и в нейното представяне.

Всичко това ми дава основание за цялостна отлична оценка на дисертационния труд, въз основа на която предлагам на уважаемото жури да гласува положително за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“ на редовен докторант **Никола Николов Атанасов**, в област на висше образование в област на висше образование **5. Технически науки, Професионално направление – 5.11. Биотехнологии** (ДП. Технология на биологично активните вещества.

Гр. София

24.07.2024

Рецензент .....

(проф. д-р Светла Данова, дн)