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 Биологически науки
Докторска програма: Микробиология

ТЕМА: „МОЛЕКУЛНИ И ФУНКЦИОНАЛНИ АНАЛИЗИ НА ПРОБИОТИЧНИ ЩАМОВЕ ОТ РОД *LACTOBACILLUS*”

Виктория Йонкова Маринова-Йорданова

Научен ръководител: **проф. д-р Петя Христова**

София, 2026 г.

Дисертационният труд е представен на 196 стандартни машинописни страници и съдържа 14 таблици, 23 фигури и 2 приложения. Библиографската справка включва 402 литературни източника.

Експерименталните изследвания са проведени в лабораториите на катедра „Обща и промишлена микробиология“ към Биологически факултет на Софийски университет „Св. Климент Охридски“ и в хода на изпълнението на част от поставените задачи в настоящия дисертационен труд е използвана апаратура при Център за компетентност „Устойчиво оползотворяване на био-ресурси от лечебни и ароматични растения за иновативни продукти“ (БИОРЕСУРСИ БГ), проект BG16RFPR002-1.014-0001.

Дисертационният труд е обсъден и приет на заседание на катедра „Обща и промишлена микробиология“ към Биологически факултет на Софийски университет „Св. Климент Охридски“, състояло се на 22. 01. 2026г и насрочен за защита пред научно жури, сформирано със заповед …… на Ректора на Софийски университет „Св. Климент Охридски“.

***Вътрешни членове на научното жури**:*

1. .....
2. .....

***Външни членове на научното жури**:*

3. .....
4. .....
5. .....

Публичната защита на дисертационният труд ще се проведе на ……. 2026г. от …… часа в …….. .

Изказвам искрена благодарност към своя научен ръководител проф. д-р Петя Христова, за оказаната ми подкрепа, помощ и разбиране при изготвянето и оформянето на настоящия дисертационен труд.

Благодаря на доц. д-р Илияна Рашева и на доц. д-р Йоана Кижева за ценната подкрепа и методически насоки, които получих, както и на колективите на лаборатории 117 и 144, както и на всички колеги от катедра „Обща и промишлена микробиология" за разбирането и оказаното съдействие през периода на изготвянето на дисертационния ми труд.

Не на последно място, изказвам искрена и дълбока благодарност на семейството си оказаната безрезервна подкрепа.

СЪДЪРЖАНИЕ

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ 6

СПИСЪК НА ТАБЛИЦИ 9

СПИСЪК НА ФИГУРИ 10

УВОД 12

ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР 14

1. Обща характеристика на млечнокисели бактерии. 14

1.1 Рекласификация на видовете от род *Lactobacillus*. 15

1.2 Лактобацилите като част от семейство *Lactobacillaceae*. 18

2. Лактобацилите като потенциални пробиотици. 20

2.1 Кратка история и дефиниция за пробиотиците. 21

2.2 Критерии за селекция на потенциални пробиотични щамове. 21

2.3 Полезни свойства на пробиотичните бактерии. 25

3. Механизми на пробиотичното действие. 26

3.1 Молекули при лактобацилите поддържащи пробиотичното действие. 30

3.2 Механизъм на адхезията. 34

3.3 *In vitro* и *in vivo* адхезионни модели. 36

3.4 Адхезини при млечнокисели бактерии и тяхната роля в пробиотичния потенциал. 38

3.5 Мукус свързващ протеин (Mub). 40

3.5.1 Протеин (MapA), стимулиращ адхезията към мукуса. 41

3.5.2 Елонгиращ фактор (Ef-Tu) и фактор GroEl. 41

3.6 Фактори промотиращи агрегационната способност. 42

3.6.1 Авто- и ко-агрегационна способност при млечнокиселите бактерии. 43

3.6.2 Синтез на антимикробни вещества. 46

3.7 Антиоксидантна активност. 49

3.8 Образуване на микробни биофилми. 50

4. Оценка за безопасност на кандидат – пробиотици. 51

4.1 Оценка на антибиотичната резистентност. 51

4.2 Хемолитична активност. 54

ЦЕЛ 55

ЗАДАЧИ 55
МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ 56
I. МАТЕРИАЛИ 56
1. Микроорганизми, обект на изследването. 56
2. Референтни тест-микроорганизми. 56
3. Хранителни среди, разтвори и реактиви. 57
3. 1 Хранителни среди. 57
3. 2 Други хранителни среди. 58
3. 3 Буфери. 59
3. 4 Разтвори. 59
3. 5 Реактиви. 60
4. Апаратура. 60
II. МЕТОДИ 61
1. Възстановяване на предоставените млечнокиселите култури. 61
2. Фенотипна характеристика на млечнокиселите бактерии. 61
2.1 Макроморфологична характеристика. 61
2.2 Микроморфологична характеристика. 61
2.3 Тест за каталазна активност. 61
2.4 Тест за оксидазна активност. 62
3. Генотипна характеристика. 62
4. Съхранение и поддържане на колекция от щамове на млечнокисели бактерии. 62
5. Методи, използвани за оценяване на пробиотичния потенциал на създадената колекция млечнокисели бактерии. 62
5. 1 Антимикробна активност. 62
5. 2 Определяне на общия антиоксидантен капацитет. 63
5. 3 Продукция на водороден пероксид (H_2O_2). 63
5. 4 Определяне на агрегационната способност. 64
5. 5 Определяне на адхезионната способност. 65
5. 6 Хидрофобност- MAH (Microbial Adhesion to Hydrocarbon) тест. 68
5. 7 Анализ на молекули от клетъчна повърхност на изследваните МКБ, участващи в механизмите на агрегация. 68
5. 8 Детектиране наличието или отсъствието на гени, отговорни за механизмите на свързване и адхезия. 70
5. 9 Оценка на безопасността на изследваните млечнокисели бактерии. 73

5. 10 PCR анализ на гени, свързани с образуване на биогенни амини. ... 75

5. 11 Изследване на хемолитична активност. ... 76

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ ... 77

I. Морфологична и генетична характеристика на колекционни щамове млечнокисели бактерии, изолирани от различни екологични ниши ... 77

1.1 Общи данни за изследваната колекция от лактобацили. ... 77

1.2 Видов състав на колекцията от лактобацили. ... 80

II. Функционална оценка на пробиотичните свойства на проучваните млечнокисели бактерии ... 86

2.1 Антимикробна активност на изследваните лактобацили срещу референтни тест-култури на Грам-отрицателни и Грам-положителни бактерии. ... 86

2.2 Оценка на общия антиоксидантен капацитет. ... 91

2.3 Определяне на способността за продукция на водороден пероксид (H_2O_2). ... 94

2.4 Изследване на агрегационната способност. ... 96

2.5 Изследване на адхезионната способност на лактобацилите. ... 111

2.6 Определяне способността на МКБ да адхезират към имобилизиран муцин. ... 117

2.7 Изследване на повърхностните характеристики на МКБ - тест за хидрофобност. ... 120

2.8 Анализ на молекули от клетъчна повърхност на изследваните МКБ, участващи в механизмите на агрегация. ... 123

2.9 Изследване наличието на гени, отговорни за механизмите на свързване и адхезия при МКБ. ... 131

III. Безопасност на създадената колекция МКБ, като основно изискване за потенциалното им включване в пробиотичен продукт ... 135

3.1 Изследване на антибиотичната резистентност. ... 135

3.2 PCR анализ на гени, свързани с образуване на биогенни амини. ... 142

3.3 Изследване на хемолитичната активност. ... 143

ИЗВОДИ ... 145

ПРИНОСИ ... 147

I. Приноси с фундаментален характер ... 147

II. Приноси с приложен характер ... 147

ЛИТЕРАТУРА ... 148

ПРИЛОЖЕНИЯ ... 187

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

- **APF** - Aggregation-Promoting Factor/ Агрегация промотиращ фактор - секретиран протеин, открит в някои щамове лактобацили, по-специално *L. gasseri* и *L. plantarum*. APF играе роля в поддържането на формата на клетките и прилепването им към други клетки и субстрати.
- **AR** - Antibiotic resistance/ Антибиотична резистентност - възниква, когато бактериите еволюират и стават по-малко податливи на ефектите на антибиотиците.
- **ATCC** - American Type Culture Collection/ Американска колекция на типови култури.
- **CFS** - Cell-free supernatant/ Свободна от клетъчна биомаса супернатанта - отнася се до течната компонента, оставаща след центрофугиране на култура от микроорганизми.
- **CFU** - Colony forming unit/ Колонообразуваща единица.
- **DNA** - Deoxyribonucleic acid/ ДНК - Дезоксирибонуклеиновата киселина.
- **EFSA** - The European Food Safety Authority/ Европейска агенция по безопасност на храните - предоставя независими научни съвети относно рисковете, свързани с храните.
- **EPM** - Embden-Mayerhof-Parnas/ Ембден-Майерхоф-Паарнас – биохимичен метаболитен път, известен още като гликолиза, е процес, който превръща глюкозата в пируват, генерирайки АТФ и НАДН.
- **EPS** - Exopolysaccharides/ Екзополизахариди - сложни въглехидрати или полизахариди, произвеждани и секретирани от различни микроорганизми, включително бактерии, гъби и водорасли.

- **GOS** - Galactooligosaccharides/ Галактоолигозахариди - Пребиотици, които насърчават растежа на полезни бактерии в червата, често срещани в хранителните продукти.
- **GRAS** - Generally Recognized As Safe/ Общопризнат за безопасен - Едно вещество може да бъде GRAS само ако общото му признание за безопасност се основава на становищата на експерти, квалифицирани да оценят безопасността на веществото. GRAS статусът може да се основава или на история на безопасна употреба в храни преди 1958 г., или на научни процедури, които изискват същото количество и качество на доказателства, каквито биха били необходими за получаване на регламент за хранителни добавки.
- **GTP-свързващ протеин** - представлява белтък, който свързва гуанозинтрифосфат (GTP) и играе ключова роля в клетъчната сигнализация и регулацията на клетъчните процеси**.**
- **HRP** - Horseradish Peroxidase/ Хрянова пероксидаза - Ензим, използван като детектор/индикатор в различни научни анализи, включително ELISA и Western blotting.
- **LTA** - Lipoteichoic acid/ Липотейхоеви киселини - вид тейхоева киселина, намираща се в клетъчната стена на грам-положителни бактерии, специфично свързана с цитоплазмената мембрана чрез липидна котва.
- **MAH test** - Microbial Adhesion to Hydrocarbons test/ Тест за хидрофобност - Тест, който изследва хидрофобността и адхезията на микробните клетки към хидрофобни повърхности.
- **MAM** - Mucosa-associated microbiota/ Мукозно-асоциирана микробиота - отнася се до микробната общност, обитаваща слузния слой на стомашно-чревния тракт, по-специално в непосредствена близост до чревния епител.

- **MRS -** De Man, Rogosa and Sharp – селективна хранителна среда за млечнокисели бактерии.
- **NCFS** - native free cell supernatants – нативна безклетъчна супернатанта.
- **PBS -** Phosphate Buffered Saline/Фосфатен буфер.
- **PCR** - Polymerase Chain Reaction/ Полимеразна верижна реакция.
- **PG** - Peptidoglycan/ Пептидоглюкан - жизненоважен структурен компонент на бактериалната клетъчна стена.
- **QPS** - Qualified Presumption of Safety/ Квалифицирана презумпция за безопасност - Това е процедура за оценка на безопасността на микроорганизми, използвани в хранителната верига, разработена от Европейския орган за безопасност на храните (EFSA).
- **ROS** - Reactive oxygen species/ Реактивни кислородни видове/форми.
- **TMB** - 3,3′,5,5′-Tetramethylbenzidine/ 3,3′,5,5′- Тетраметилбензидин - широко използван хромогенен субстрат в лабораторни условия, особено в ензимно-свързани имуносорбентни анализи (ELISA) и други техники, където се използва хрянова пероксидаза (HRP).
- **WHO** - The World Health Organization/ СЗО - Световна Здравна Организация - е специализирана агенция на Организацията на обединените нации, която координира реакциите при международни проблеми и извънредни ситуации в областта на общественото здраве.
- **WTA** - Wall teichoic acid/ Тейхоеви киселинни част от клетъчната стена на Грам (+) бактерии.
- **XLDA -** Xylose, lysine, deoxycholate agar .
- **ГИТ** - Гастроинтестинален тракт, стомашно чревен тракт.
- **МКБ -** Млечнокисели бактерии.
- **НБПМКК** – Национална банка по промишлени микроорганизми и клетъчни култури.

УВОД

През последните десетилетия стана ясно, че човешкото тяло съществува в тясна симбиоза с изключително сложна микробна екосистема, съставена от над 1000 различни бактериални вида, които обитават устната кухина, горните дихателни пътища, стомашно-чревния тракт, вагината и кожата. Тази съвкупност от микроорганизми, позната като микробиом, се формира скоро след раждането и се запазва през целия живот. Микроорганизмите в нея изпълняват редица съществени функции за физиологията на гостоприемника - участват в разграждането и усвояването на хранителни вещества, предпазват от колонизация от патогенни бактерии, модулират имунните отговори, регулират натрупването на мазнини и стимулират ангиогенезата в червата. Въпреки това, пълното разбиране за ролята на отделните бактериални видове в поддържането на човешкото здраве остава сериозно научно предизвикателство.

В тази връзка, темата за т.нар пробиотици е изключително актуална в наши дни. Всъщност, пробиотиците представляват бактериални добавки, които, когато се прилагат в достатъчно количество, подпомагат здравето на гостоприемника чрез модифициране на микробиотата в конкретната телесна ниша. Все повече изследователи се опитват да разберат механизмите на действие на различни пробиотични щамове, за да докажат полезният им ефект като съпътстваща терапия при различни заболявания. При анализ на литература и различни изследвания, става ясно, че науката върви на прав път, а именно, разбирането на така сложните взаимодействия на различни щамове млечнокисели бактерии с рецепторите в стомашно-чревния тракт на гостоприемника, всички активни сигнални пътища, посредством свързването им с рецептори на лигавицата и взаимодействието им с различни патогенни микроорганизми, като „щит“ срещу техния патогенен ефект.

Различни микроорганизми в момента се използват като хуманни пробиотици – сред тях представители на родовете *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* са най-често използваните. Повечето от настоящите търговски пробиотични щамове не са избрани за конкретни приложения, а по-скоро въз основа на техния технологичен потенциал. Въпреки това е добре известно, че пробиотичните ефекти на млечнокиселите бактерии са специфични за конкретен щам, следователно е много вероятно да бъдат избрани щамове с по-добри резултати и свойства, когато се следва рационален, специфичен за употребата процес на подбор. Механизмите на действие на пробиотиците не са напълно изяснени, но се предполага, че те включват: продукция на бактериоцини, които инхибират растежа на патогенни микроорганизми, модулиране на имунния отговор на организма, както и конкуренция с патогените за свързване към рецептори в мукозния слой на червата. Един от ключовите критерии за избор на потенциални пробиотици е способността за адхезия и колонизиране на стомашно-чревния тракт на гостоприемника.

Тези научни тенденции очертаха и целта на настоящия дисертационен труд - да се допринесе за едно по-задълбочено изучаване на биологичния потенциал, молекулните и функционални механизми на действие, които са по-слабо проучени, спрямо други аспекти от пробиотичния потенциал на представители на семейство *Lactobacillaceae*, подходящи за създаване на нови пробиотични продукти или включването им в хранително-вкусовата индустрия. В научния труд е предвидено характеризирането на колекция от щамове, покриващи критериите за млечнокисели бактерии, изолирани от по-слабо изследвани до този момент в България екологични ниши, а именно майчина кърма, фецес от новородени и традиционни български ферментирали млечни и зеленчукови храни.

ЦЕЛ

Целта на настоящия дисертационен труд е да се изучат основните молекулни и функционални характеристики, свързани с пробиотичния потенциал на лактобацили, изолирани от слабо изследвани до този момент в България екологични ниши.

ЗАДАЧИ

За постигането на определената цел са поставени следните експериментални задачи за изпълнение:

1. **Морфологична и генетична характеристика на колекционни щамове млечнокисели бактерии, изолирани от различни екологични ниши.**
2. **Функционална оценка на пробиотичните свойства на проучваните млечнокисели бактерии чрез определяне на:**

   2.1 Антимикробната активност, антиоксидантната активност и продукция на водороден пероксид.

   2.2 Агрегационна, ко-агрегационна и адхезионна способност на изследваните щамове.

   2.3 Оценка на повърхностни молекули свързани с агрегационната способност.

   2.4 Наличието или отсъствието на гени отговорни за механизмите на свързване и адхезия при млечнокиселите бактерии.

3. Оценка на безопасността на колекцията от млечнокисели изолати.

3.1 Изследване на генотипната и фенотипна антибиотична резистентност на изследваните изолати.

3.2 Изследване за наличие на гени за образуване на биогенни амини.

3.3 Изследване на хемолитичната активност на млечнокиселите изолати.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

I. МАТЕРИАЛИ

1. Микроорганизми, обект на изследването.

Обект на настоящия дисертационен труд са деветдесет и четири изолата/щама млечнокисели бактерии, представители на семейство *Lactobacillaceae*, изолирани от разнообразни екологични ниши като: ферментирали зеленчукови и млечни храни (кисело зеле, ферментирали зелени домати, ферментирали краставици, кефир, бяло сирене и извара), както и от майчина кърма и фецес на новородени Всички щамове са част от колекцията на катедра „Обща и промишлена микробиология" към Биологически факултет на Софийски университет „Св. Климент Охридски", изолирани и идентифицирани в предходни изследвания, и предоставени за целите на настоящото изследване (Маринова, 2020; Дерменджиева, 2022; Marinova-Yordanova *et al*., 2024).

2. Референтни тест-микроорганизми.

В процеса на определяне на пробиотичния потенциал на колекцията от млечнокисели бактерии, като тест-микроорганизми са използвани референтните микроорганизми, изброени в **Табл. 1**.

Таблица 1. *Референтни тест-микроорганизми.*

Тест- микроорганизъм	Колекция/ Щам	Предоставена от
Candida albicans	ATCC 10231	НБПМКК
Escherichia coli	ATCC 25922	НБПМКК
Listeria innocua	SLCC 3379 ATCC 33090	НБПМКК
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 3732	НБПМКК
Salmonella enterica subsp. *enterica* ser. Enteritidis	ATCC 13076	НБПМКК
Staphylococcus aureus	ATCC 6538	НБПМКК

3. Хранителни среди, разтвори и реактиви.

3. 1 Хранителни среди.

3. 2 Други хранителни среди.

3. 3 Буфери.

3. 4 Разтвори.

3. 5 Реактиви.

4. Апаратура.

II. МЕТОДИ

1. **Възстановяване на предоставените млечнокисели култури.**
2. **Фенотипна характеристика на млечнокиселите бактерии.**
   - **2.1 Макроморфологична характеристика.**
   - **2.2 Микроморфологична характеристика.**
   - **2.3 Тест за каталазна активност.**
   - **2.4 Тест за оксидазна активност.**
3. **Генотипна характеристика.**
4. **Съхранение и поддържане на колекция от щамове на млечнокисели бактерии.**
5. **Методи използвани за оценяване на пробиотичния потенциал на създадената колекция млечнокисели бактерии.**
   - **5.1 Антимикробна активност.**
   - **5.2 Определяне на общия антиоксидантен капацитет.**
   - **5.3 Продукция на водороден пероксид (H_2O_2).**
   - **5.4 Определяне на агрегационната способност.**
   - **5.5 Определяне на адхезионната способност.**
   - **5.6 Хидрофобност - MAH (Microbial Adhesion to Hydrocarbon) тест.**
   - **5.7 Анализ на молекули от клетъчна повърхност на изследваните МКБ, участващи в механизмите на агрегация.**
   - **5.8 Детектиране наличието или отсъствието на гени отговорни за механизмите на свързване и адхезия.**

5.9 Оценка на безопасността на изследваните млечнокисели бактерии.

5.10 PCR анализ на гени, свързани с образуване на биогенни амини.

5.11 Изследване на хемолитичната активност.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

I. Морфологична и генетична характеристика на колекционни щамове млечнокисели бактерии, изолирани от различни екологични ниши

1.1 Общи данни за изследваната колекция от лактобацили.

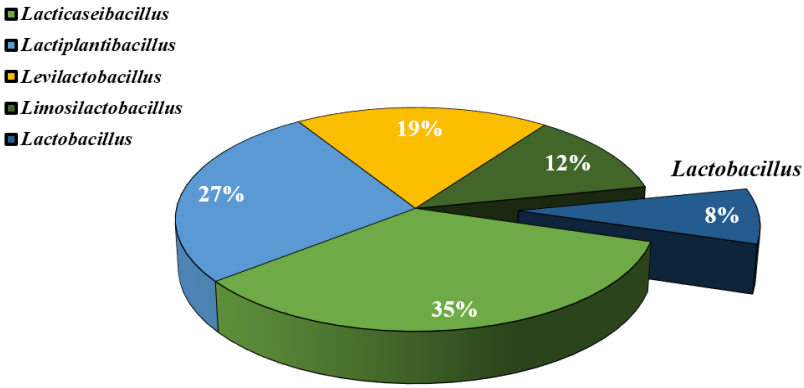
В настоящото изследване са изследвани деветдесет и четири изолата на млечнокисели бактерии (МКБ), предоставени от колекцията на катедра „Обща и промишлена микробиология“ към Биологически факултет на Софийски университет „Св. Климент Охридски“. Щамовете са изолирани от различи екологични ниши в предходни изследвания в катедрата. От тях, четиридесет и пет щама произхождат от традиционно ферментирали зеленчукови и млечни продукти, а останалите четиридесет и девет щама са изолирани от майчина кърма и фецес на новородено. Щамовете са получени от 4 проби ферментирали зеленчукови храни (две проби от кисело зеле, по една проба от кисели краставички и кисели зелени домати), 3 проби ферментирали млечни продукти (по една проба от извара, кефир и бяло саламурено сирене), 11 проби от майчина кърма (различни донорки) и 1 проба от фецес на новородено. Произходът на щамовете по проби е както следва: двадесет и пет щама произхождат от ферментирали зеленчукови храни, двадесет от млечнокисели продукти, двадесет и шест са изолирани от фекалната проба и двадесет и три произхождат от майчина кърма.Всички щамове са възстановени в течна хранителна среда MRS както е описано в раздел „Материали и методи“ с последваща проверка за чистота на MRS агар до получаване на единични колонии.

1.2 Видов състав на колекцията от лактобацили.

В предходните изследвания всички щамове са анализирани фенотипно и генотипно и са определени като представители на род *Lactobacillus* (Маринова, 2020). Идентификацията е провеждана в различни години, което обяснява използването на различни подходи (**Табл. 2**). Както се вижда от таблицата, 61

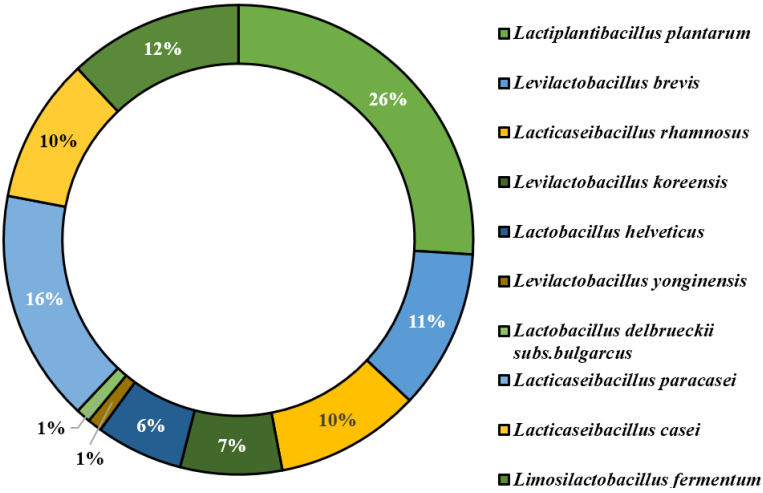
щама са идентифицирани чрез секвениране на фрагмент от 16S rDNA с процент на сходство от 97,9-99 %, 17 изолата са определени чрез MALDI-TOF и 16 посредством видово-специфичен PCR. В хода на всички проведени изследвания са идентифицирани 10 вида лактобацили, които към онзи момент са включени в род *Lactobacillus*: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus koreensis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus yonginensis*, *Lactobacillus delbrueckii subs. bulgaricus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus casei u Lactobacillus fermentum.*

Въведената нова таксономична рекласификация, предложена от Zheng et al. (2020), на родовете в семейство Lactobacillaceae и по специално разделянето на генетично хетерогенните групи в род *Lactobacillus* наложи таксономично преразпределяне на изолатите в колекцията към следните родове: Lactobacillus, *Lactiplantibacillus, Levilactobacillus, Lacticaseibacillus* и *Limosilactobacillus* (**Фиг. 1**). Така според новата рекласификация 8 % от щамовете в колекцията остават с идентификация на видове от род *Lactobacillus*. Най-голям дял от щамовете са причислени към род *Lacticaseibacillus* (35 %), следвани от щамовете отнесени към род *Lactiplantibacillus* (27%), докато изолати от родовете *Levilactobacillus* са 19 % и *Limosilactobacillus* са 12 %, съответно.



Фигура 1. *Родово разнообразие на млечнокиселите бактерии, изолирани от различни екологични ниши, обект на настоящия дисертационен труд.*

Според новата таксономична схема наименованията на десетте бактериални вида, са както следва: *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subs. *bulgaricus*, *Lactiplantibacillus plantarum* (предишно наименование *Lactobacillus plantarum*), *Levilactobacillus brevis* (предишно наименование *Lactobacillus brevis*), *Levilactobacillus koreensis* (предишно наименование *Lactobacillus koreensis*), *Levilactobacillus yonginensis* (предишно наименование *Lactobacillus yonginensis*), *Lacticaseibacillus rhamnosus* (предишно наименование *Lactobacillus rhamnosus*), *Lacticaseibacillus paracasei* (предишно наименование *Lactobacillus paracasei*), *Lacticaseibacillus casei* (предишно наименование *Lactobacillus casei*) и *Limosilactobacillus fermentum* (предишно наименование *Lactobacillus fermentum*) (**Фиг. 2**).



Фигура 2. *Видово разнообразие и процентно съотношение (%) на млечнокиселите бактерии, обект на дисертацията.*

Анализите на видовия състав на колекцията показват, че в изследваните биотопи най-разпространеният вид е *L. plantarum* (26%). Нещо повече, този вид съставлява 83% и 80% от всички изолирани МКБ от съответно фермерски и домашни проби от кисело зеле. Подобно разпространение на *L. plantarum* в

традиционни ферментирали храни е докладвано и в редица други изследвания (Behera *et al*., 2018; Hoxha *et al*., 2023). Други автори съобщават за присъствието на родовете *Leuconostoc, Weissella* и *Lactobacillus* в процеса на ферментация на кисело зеле, като отбелязват, че съставът на микрофлората от млечнокисели бактерии в тези продукти зависи основно от сорта зеле, използван като субстрат, а не от добавянето на специфични подправки към рецептата, по която е приготвено (Touret *et al*., 2018). Единственият продукт, от който *L. plantarum* не е изолиран са ферментиралите зелени домати, където основен вид е *L. koreensis*. Този вид е установен и в пробата от ферментирали кисели краставички (FC). Също така, един щам на *L. yonginensis* е изолиран от фермерско кисело зеле. Двата вида, *L. koreensis* и *L. yonginensis,* по литературни данни са по-характерни за азиатски ферментирали храни, например кимчи (Yi *et al*., 2013). До настоящия момент, това изследване представлява първото съобщение за изолиране на *L. koreensis* и *L. yonginensis* от ферментирали зеленчукови продукти в България. (Marinova-Yordanova *et al*., 2024).

В пробата от бяло саламурено сирене доминиращ вид е *L. helveticus*, който също така е идентифициран и в пробата от извара. *L. brevis* се откроява като неизменна част от ферментационната микрофлора, тъй като е установен в 57% от анализираните продукти. Според Petrova et al. (2021) по отношение на бялото саламурено сирене, нестартерната микрофлора, при този тип сирена и производни на тях продукти, като изварата, се състои от мезофилни млечнокисели бактерии, като *L. plantarum*, *Lactiplantibacillus paraplantarum*, *Lactiplantibacillus pentosus*, *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lentilactobacillus hilgardii* и *L. brevis*. Повечето от тези микроорганизми са факултативни анаероби, понасящи високи концентрации на сол и киселиност, което им позволява активно да се развиват по време на процеса на зреене на сиренето (Özer, 2014).

Сред изолатите от майчина кърма са идентифицирани пет вида млечнокисели бактерии, а именно: *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus, L. rhamnosus,*

L. paracasei, L. plantarum, и *L. fermentum*. В този биотоп доминира *L. rhamnosus*, който представлява 39 % от всички изолати от кърма. Получените резултати са в сътветствие с данните, публикувани в научната литература, които посочват *L. casei, Ligilactobacillus salivarius, L. plantarum, L. fermentum, L. rhamnosus, Lactobacillus gasseri, L. paracasei* и *Lactobacillus oris* като най-често срещани представители на млечнокисели бактерии в проби от майчина кърма (Soto *et al*., 2014; Ding *et al*., 2019; Zhang *et al*., 2020). Други автори също посочват, че *L. rhamnosus* е най-често срещаният представител сред лактобацилите в чревната микробиота на кърмачета, следван от *L. fermentum* (Ahrné *et al*., 2005).

В единствената проба от фецес са идентифицирани три вида млечнокисели бактерии, а именно: *L. paracasei, L. fermentum* и *L. casei*. Сред тях като доминиращ вид (50 %) се отличава *L. paracasei*. Подобна тенденция е докладвана от Mitsou et al. (2008), които установяват доминиране на *L. rhamnosus* и значително присъствие на *L. paracasei* в изпражненията на здрави новородени.

Таблица 2. *Видова идентификация на МКБ, изолирани от разнообразни екологични ниши.*

№	Щам	Източник на изолиране	Видове	Метод на идентификация	№	Щам	Източник на изолиране	Видове	Метод на идентификация
1	S1	Кисело зеле*	*L. plantarum*	Секвениране, 98.68 %	*32*	K7	Кефир**	*L. brevis*	Секвениране, 98.72 %
2	S2		*L. brevis*	Секвениране, 98.72 %	*33*	K8		*L. brevis*	Секвениране, 98.68 %
3	S3		*L. plantarum*	Секвениране, 98.17 %	*34*	WC1	Бяло саламурено сирене**	*L. helveticus*	Секвениране, 98.62 %
4	S4		*L. plantarum*	Секвениране, 98.71 %	*35*	WC2		*L. helveticus*	Секвениране, 98.77 %
5	S5		*L. plantarum*	Секвениране, 98.68 %	*36*	WC3		*L. helveticus*	Секвениране, 98.68 %
6	S6	Кисело зеле**	*L. plantarum*	Секвениране, 98.78 %	*37*	WC4		*L.helveticus*	Секвениране, 98.68 %
7	S7		*L. plantarum*	Секвениране, 98.54 %	*38*	WC5		*L. helveticus*	Секвениране, 98.72 %
8	S7'		*L. plantarum*	Секвениране, 98.72 %	*39*	WC6		*L. plantarum*	Секвениране, 98.89 %
9	S8		*L. plantarum*	Секвениране, 98.71 %	*40*	I1	Извара**	*L. plantarum*	Секвениране, 98.72 %
10	S9		*L plantarum*	Секвениране, 99.80 %	*41*	I2		*L. plantarum*	Секвениране, 98.88 %
11	S10		*L. plantarum*	Секвениране, 98.68 %	*42*	I3		*L. brevis*	Секвениране, 98.73 %
12	S11		*L. plantarum*	Секвениране, 98.88 %	*43*	I4		*L. helveticus*	Секвениране, 98.77 %
13	S12		*L. plantarum*	Секвениране, 98.68 %	*44*	I5		*L. plantarum*	Секвениране, 99.70 %
14	S13		*L. plantarum*	Секвениране, 98.68 %	*45*	I6		*L. brevis*	Секвениране, 98.88 %
15	S14		*L. plantarum*	Секвениране, 98.78 %	*46*	1V	Фецес	*L. paracasei*	MALDI-TOF, 2.35
16	S15		*L. brevis*	Секвениране, 98.65 %	*47*	2V		*L. paracasei*	MALDI-TOF, 2.19
17	S16		*L. yonginensis*	Секвениране, 98.77 %	*48*	3V	Кърма	*L. paracasei*	MALDI-TOF, 2.18
18	FGT1	Ферментирали зелени домати**	*L. koreensis*	Секвениране, 98.68 %	*49*	4V	Фецес	*L. fermentum*	PCR
19	FGT2		*L. koreensis*	Секвениране, 98.70 %	*50*	5V	Кърма	*L. fermentum*	PCR
20	FGT3		*L. koreensis*	Секвениране, 98.72 %	*51*	6V	Фецес	*L. fermentum*	PCR
21	FGT4		*L.koreensis*	Секвениране, 98.78 %	*52*	7V		*L. casei*	PCR
22	FC1	Ферментирали кисели краставички**	*L. plantarum*	Секвениране, 98.54 %	*53*	8V		*L. casei*	PCR
23	FC2		*L. koreensis*	Секвениране, 98.72 %	*54*	9V		*L. casei*	PCR
24	FC3		*L. koreensis*	Секвениране, 98.72 %	*55*	10V		*L. paracasei*	MALDI-TOF, 2.11
25	FC4		*L. koreensis*	Секвениране, 98.89 %	*56*	11V		*L. fermentum*	PCR
26	K1	Кефир**	*L. brevis*	Секвениране, 99.68 %	*57*	12V	Кърма	*L. fermentum*	PCR
27	K2		*L. brevis*	Секвениране, 98.80 %	*58*	13V	Фецес	*L. paracasei*	MALDI-TOF, 2.11
28	K3		*L. plantarum*	Секвениране, 98.68 %	*59*	14V	Кърма	*L. fermentum*	PCR
29	K4		*L. brevis*	Секвениране, 97.88 %	*60*	15V	Фецес	*L. casei*	PCR
30	K5		*L. brevis*	Секвениране, 98.89 %	*61*	16V		*L. paracasei*	MALDI-TOF, 2.05
31	K6		*L. plantarum*	Секвениране, 99.97 %	*62*	17V		*L. fermentum*	PCR

63	18V	Кърма	*L. fermentum*	PCR	*79*	34V	Фецес	*L. paracasei*	MALDI-TOF, 2,19
64	19V	Фецес	*L. paracasei*	MALDI-TOF, 2.13	*80*	36V	Кърма	*L. rhamnosus*	Секвениране, 97.97 %
65	20V		*L. casei*	PCR	*81*	37V		*L. rhamnosus*	Секвениране, 98.88 %
66	21V	Кърма	*L. fermentum*	MALDI-TOF, 2.20	*82*	38V		*L. rhamnosus*	Секвениране, 98.76 %
67	22V	Фецес	*L. paracasei*	MALDI-TOF, 2.35	*83*	39V		*L. rhamnosus*	Секвениране, 98.83 %
68	23V	Кърма	*L. fermentum*	MALDI-TOF, 2.13	*84*	40V		*L. rhamnosus*	Секвениране, 98.68 %
69	24V	Фецес	*L. casei*	PCR	*85*	41V		*L. delbrueckii*/	Секвениране, 98.88 %
70	25V	Кърма	*L. fermentum*	MALDI-TOF, 2.10	*86*	42V		*L. rhamnosus*	Секвениране, 98.80 %
71	26V	Фецес	*L. paracasei*	MALDI-TOF, 2.17	*87*	43V		*L. paracasei*	Секвениране, 98.72 %
72	27V		*L. paracasei*	MALDI-TOF, 2.18	*88*	44V		*L. plantarum*	Секвениране, 98.68 %
73	28V		*L. casei*	PCR	*89*	45V		*L. rhamnosus*	Секвениране, 98.80 %
74	29V		*L. paracasei*	MALDI-TOF, 2.14	*90*	46V		*L. rhamnosus*	Секвениране, 98.68 %
75	30V		*L. paracasei*	MALDI-TOF, 2.20	*91*	47V		*L. plantarum*	Секвениране, 99.97 %
76	31V		*L. casei*	PCR	*92*	48V		*L. plantarum*	Секвениране, 98.99 %
77	32V		*L. casei*	PCR	*93*	49V		*L. rhamnosus*	Секвениране, 99.72 %
78	33V		*L. paracasei*	MALDI-TOF, 2.15	*94*	50V		*L. plantarum*	Секвениране, 98.70 %

Легенда: ***домашно приготвени продукти;** ** фермерски продукти закупени от производител.*

II. Функционална оценка на пробиотичните свойства на проучваните млечнокисели бактерии

2.1 Антимикробна активност на изследваните лактобацили срещу референтни тест-култури на Грам-отрицателни и Грам-положителни бактерии.

Млечнокиселите бактерии, обект на настоящия дисертационен труд са оценени по отношение на тяхната антимикробна активност. Антимикробният потенциал на щамовете е изследван срещу два Грам-положителни (*L. innocua*, *S. aureus*), два Грам-отрицателни вида (*S. enterica* ser. Enteritidis и *E. coli*) и една дрождева култура (*C. albicans*). Антимикробната активност на безклетъчните супернатанти (CFS) е определена по методика описана в раздел „Материали и методи“ като са тествани следните три варианта – нативна безклетъчна супернатанта с кисело pH (NCFS), безклетъчна супернатанта с pH 6 (NtCFS) и термично обработена и неутрализирана безклетъчна супернатанта (htNtCFS).

При анализът на щамовете изолирани от ферментирали млечни и зеленчукови храни антибактериална активност срещу тест-микроорганизмите е установена само при варианта на нативните безклетъчни супернатанти с кисело pH (NCFS) (**Табл. 3**), докато при останалите варианти (NtCFS) и (htNtCFS) не се наблюдава инхибиращ ефект. Това предполага, че изолатите не продуцират бактериоцини или подобни на тях съединения, а наблюдаваната активност се дължи вероятно на органични киселини, водороден пероксид или други инхибиращи метаболити. При други изследвания в литературата ефекта на бактериоцините се проявява само в безклетъчни супернатанти, които са били предварително термично обработени и неутрализирани до pH 6,5 (Cizeikiene *et al.*, 2013).

Резултатите представени на **Табл. 3** показват, че щамовете *L. plantarum* (изолирани от фермерско кисело зеле) проявяват антагонизъм в различна степен срещу *E. coli* (57 %) и *S. enterica* ser. Enteritidis (19 %). Слаба антимикробна активност (1-2 mm инхибиторна зона) срещу *L. innocua* и *S. aureus* е установена

съответно при 24 % и 29 % от изолатите. Подобно ниска активност спрямо *S.* Enteritidis, *E. coli* и *S. aureus* е наблюдавана и при двата щама *L. koreensis* (FGT2 и FC2). Само един щам *L. brevis* (S15), изолиран отново от занаятчийско кисело зеле проявява антимикробна активност срещу *E. coli*.

Представителите на род *Lactobacillus*, изолирани от млечни продукти, идентифицирани като *L. helveticus* не проявяват антимикробна активност към тестваните тест-микроорганизми.

При нито един от щамовете, изолирани от ферментирали храни, не е установен антимикробен потенциал срещу *C. albicans*. Антимикотичната активност на млечнокиселите бактерии е слабо проучена и рядко описвана в научната литература. Счита се, че мравчената киселина, синтезирана от *C. albicans*, определя оптималната киселинност за развитието й, което на практика неутрализира един от основните механизми на антимикробно действие на МКБ, а именно продукцията на органични киселини (Lertcanawanichakul, 2005).

Таблица 3. *Антимикробна активност на NCFS на МКБ изолирани от ферментирали продукти с различен произход.*

Щамове	Тест-микроорганизми (зона на инхибиране, mm)				
	S. Enteritidis	*L. innocua* F	*E. coli*	*S. aureus*	*C. albicans*
L. plantarum S1	-	-	-	-	-
L. brevis S2	-	-	-	-	-
L. plantarum S3	-	-	+/-*	-	-
L. plantarum S4	-	-	14.0 ± 0.50	+/-	-
L. plantarum S5	-	-	16.0 ± 0.25	+/-	-
L. plantarum S6	-	-	14.0 ± 0.75	+/-	-
L. plantarum S7	12.0 ± 0.01	-	12.0 ± 0.04	+/-	-
L. plantarum S7'	-	-	11.0 ± 0.05	-	-
L. plantarum S8	-	+/-	11.0 ± 0.04	-	-
L. plantarum S9	11.0 ± 0.05	-	13.0 ± 0.75	-	-
L. plantarum S10	11.0 ± 0.01	+/-	12.0 ± 0.05	-	-
L. plantarum S11	11.0 ± 0.25	+/-	13.0 ± 0.50	-	-
L. plantarum S12	+/-	+/-	11.0 ± 0.04	-	-
L. plantarum S13	-	-	16.0 ± 0.75	-	-
L. plantarum S14	-	-	12.0 ± 0.05	-	-
L. brevis S15	-	-	11.0 ± 0.50	-	-
L. yonginensis S16	-	-	-	-	-
L.koreensis FGT1	-	-	-	-	-
L. koreensis FGT2	+/-	-	+/-	-	-
L.koreensis FGT3	-	-	-	-	-
L. koreensis FGT4	-	-	-	-	-
L. plantarum FC1	-	-	-	-	-
L. koreensis FC2	+/-	-	+/-	+/-	-
L. koreensis FC3	-	-	-	-	-
L. koreensis FC4	-	-	-	-	-
L. brevis K1	-	-	-	-	-
L. brevis K2	-	-	-	-	-
L. plantarum K3	-	+/-	-	+/-	-
L. brevis K4	-	-	-	-	-
L.brevis K5	-	-	-	-	-
L. plantarum K6	-	-	-	-	-
L. brevis K7	-	-	-	-	-
L. brevis K8	-	-	-	-	-
L. helveticus WC1	-	-	-	+/-	-
L. helveticus WC2	-	-	-	-	-
L. helveticus WC3	-	-	-	-	-
L. helveticus WC4	-	-	-	-	-
L. helveticus WC5	-	-	-	-	-
L. plantarum WC6	-	-	-	-	-
L. plantarum I1	-	-	-	-	-
L. plantarum I2	-	-	-	-	-
L. brevis I3	-	-	-	-	-
L. helveticus I4	-	-	-	-	-
L. plantarum I5	+/-	-	+/-	+/-	-
L. brevis I6	-	-	-	-	-

*****"+/-" *– много малка инхибираща зона (1 – 2 mm).*

Млечнокиселите изолати от майчина кърма и фецес показват по-ясно изразена антагонистична активност от щамовете, изолирани от ферментирали продукти. От изолатите в тези два биотопа (кърма и фецес), 61% показват антимикробна активност срещу всички патогенни тест-микроорганизми. Антимикробна активност на тези щамове също е отчетена единствено при нативните безклетъчни супернатанти с кисели стойности на pH (**Табл. 4**). Размерът на инхибиторните зони варира от 9 до 17 мм. По-големи зони на инхибиране са установени за NCFS екстракти при щамовете от видовете *L. rhamnosus, L. plantarum* и *L.fermentum* срещу *E. coli* (53%) и *S.* Entiritidis (45%), като измерените зони на инхибиране са от 9 до 15 мм. Два щама - 24V (*L. casei*) и 50V (*L. plantarum*) се отличават със силна антимикробна активност срещу *E. coli*, като при тях отчетената зона на инхибиране е 15 мм. По-малка зона на инхибиране (9 мм) е измерена при щамовете 32V (*L. casei*) и 49V (*L. rhamnosus*) срещу *S.* Entiritidis. При единственият представител на вида *L. delbrueckii* щам 41V е отчетена висока антимикробна активност с големина на зоната от 11 мм и срещу двата Грам-отрицателни патогенни вида. При останалите 33% изолати липсва изразена антимикробна активност както срещу *E. coli*, така и срещу *S.* Entiritidis.

По-нисък е отчетения процент активни щамове срещу *L. innocua* (31%) и *S. aureus* (30%) съответно. Най-голяма зона на инхибиране (15 мм) срещу *L. innocua* е измерена при два щама - 16V (*L. paracasei*) и 31V (*L. casei*), а най-малка (10 мм) при три изолата – 3V (*L. paracasei*), 6V и 17V (*L. fermentum*). Впечатление прави, че щамовете представители на вида *L. rhamnosus* и *L. plantarum*, които имат изразена висока активност срещу двата Грам-отрицателни представителя на тест-микроорганизмите, при тях не е установена активност срещу *L. innocua*. Въпреки това, проявяват силно антимикробно действие срещу *S. aureus*. Именно при изследването на изолатите от вида *L. plantarum* срещу този патогенен вид са отчетени и най-големите зони на инхибиране, формирани от супернатантите на щамове 48V (16 мм) и 50V (17 мм).

Безклетъчните супернатанти с кисело pH, получени от представителите на род *Lactobacillus*, изолирани от кърма, идентифицирани като *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, инхибират умерено (11-12 мм) развитието на тест-микроорганизмите *S. enterica* ser. Enteritidis, *E. coli* и *S. aureus*, но не и растежа на *L. innocua.*

Безклетъчните супернатанти на млечнокиселите изолати от кърма и фецес също не показват антимикотична активност срещу *C. albicans*.

Таблица 4. *Антимикробна активност на NCFS на МКБ изолирани от кърма и фецес.*

Щамове	Тест-микроорганизми (зона на инхибиране, mm)				
	S. Enteritidis	*L. innocua*	*E. coli*	*S. aureus*	*C. albicans*
L. paracasei 1V	+/-*	12.0±0.75	11±0.75	-	-
L. paracasei 2V	-	-	12±0.25	-	-
L. paracasei 3V	-	10.0±0.05	11±0.04	-	-
L. fermentum 4V	-	-	11 ± 0.50	-	-
L. fermentum 5V	-	-	-	+/-	-
L. fermentum 6V	-	10.0±0.02	-	-	-
L. casei 7V	12.0 ± 0.01	14.0±0.01	10.0 ± 0.02	-	-
L. casei 8V	+/-	-	-	-	-
L. casei 9V	+/-	-	-	-	-
L. paracasei 10V	-	13.0±0.25	-	-	-
L. fermentum 11V	11.0 ± 0.01	-	-	-	-
L. fermentum 12V	11.0 ± 0.25	12.0±0.01	12.0 ± 0.01	-	-
L. paracasei 13V	+/-	-	-	+/-	-
L. fermentum 14V	-	-	-	-	-
L. casei 15V	-	13.0±0.02	-	-	-
L. paracasei 16V	+/-	15.0±0.01	-	-	-
L. fermentum 17V	-	10.0±0.04	10.0±0.02	-	-
L. fermentum 18V	-	-	-	-	-
L. paracasei 19V	+/-	12.0±0.02	+/-	-	-
L. casei 20V	-	14.0±0.02	11.0±0.04	-	-
L. fermentum 21V	11.0±0.04	-	11.0±0.01	+/-	-
L. paracasei 22V	-	-	-	-	-
L. fermentum 23V	+/-	-	11.0±0.02	-	-
L. casei 24V	-	-	15.0±0.02	-	-
L. fermentum 25V	-	-	-	+/-	-
L. paracasei 26V	-	13.0±0.01	-	-	-
L. paracasei 27V	-	13.0±0.05	-	-	-
L. casei 28V	11.0 ± 0.05	-	-	-	-
L. paracasei 29V	-	-	-	-	-
L. paracasei 30V	-	-	-	-	-
L. casei 31V	+/-	15.0±0.01	-	-	-
L. casei 32V	9.0±0.03	13.0±0.04	-	-	-
L. paracasei 33V	10.0±0.01	-	-	-	-
L. paracasei 34V	+/-	-	-	-	-
L. rhamnosus 36V	11.0 ±0.02	-	11±0.01	13±0.02	-
L. rhamnosus 37V	11.0 ±0.75	-	11±0.03	9±0.01	-
L. rhamnosus 38V	11.0 ±0.03	-	12±0.01	9±0.02	-
L. rhamnosus 39V	10.0 ±0.05	-	12±0.75	9±0.02	-
L. rhamnosus 40V	11.0 ±0.03	-	11±0.02	12±0.04	-
L. delbrueckii 41V	11.0 ±0.026	-	11±0.01	12±0.01	-
L. rhamnosus 42V	11.0 ±0.05	-	11±0.01	9±0.01	-
L. paracasei 43V	10.0 ±0.02	-	12±0.04	9±0.04	-
L. plantarum 44V	11.0 ±0.03	-	13±0.01	9±0.01	-
L. rhamnosus 45V	13.0 ±0.01	-	13±0.02	14±0.02	-
L. rhamnosus 46V	12.0 ±0.05	-	12±0.04	9±0.50	-
L. plantarum 47V	11.0 ±0.03	-	14±0.50	15±0.01	-
L. plantarum 48V	12.0 ±0.01	-	13±0.03	16±0.04	-
L. rhamnosus 49V	9.0 ±0.04	-	10±0.01	10±0.01	-
L. plantarum 50V	13.0 ±0.02	-	15±0.01	17±0.02	-

*****"+/-" – *много малка инхибираща зона (1 – 2 mm).*

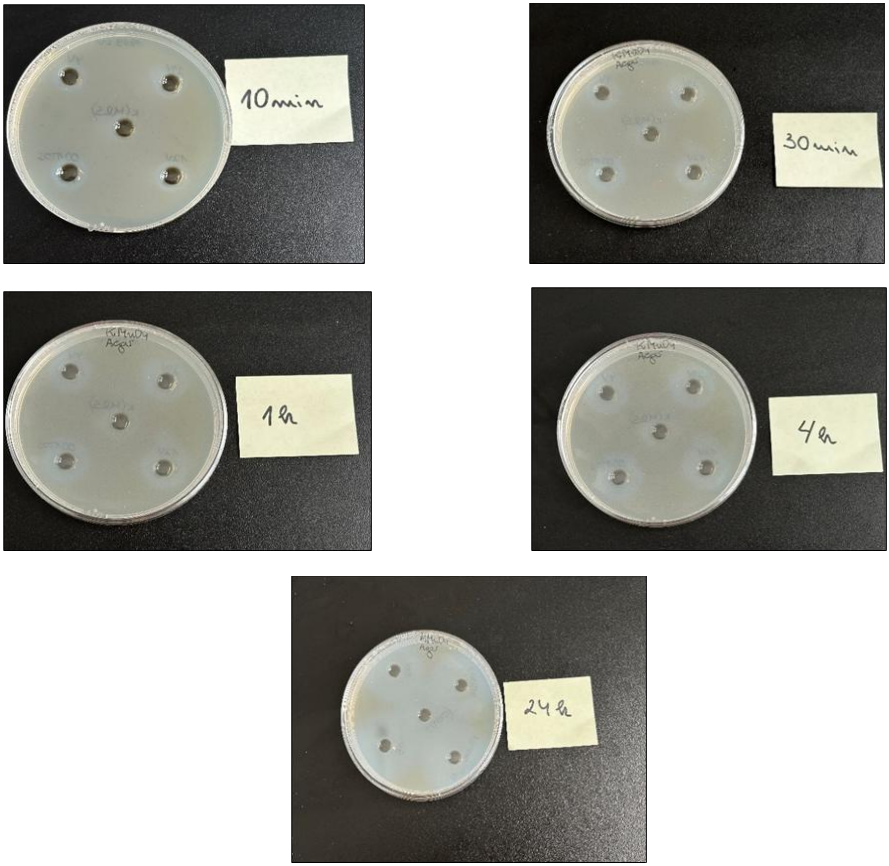
2.2 Оценка на общия антиоксидантен капацитет.

Всички безклетъчни екстракти на изследваните млечнокисели бактерии показват антиоксидантна активност. Предполага се, че положителните резултати се дължат на реакцията между органичните антиоксидантни съединения в безклетъчните супернатанти (CFS) и калиевия перманганат ($KMnO_4$), при която се формират обезцветени зони около ямките в хранителната среда (Atanasov *et al*., 2023). Диаметърът на тези обезцветени зони е индикатор за количеството произведен антиоксидант, тъй като редокс реакцията между CFS и $KMnO_4$ е количествена. Още 10 минути след началото на експеримента се наблюдава появата на слабо изразени обезцветени зони. На 30-та минута, 1-вия час и 4-тия час зоните са ясно диференцирани и щамовете *L. paracasei* 3V, *L. fermentum* (4V, 5V, 12V, 14V), *L. casei* 9V, *L. rhamnosus* 42V, L. *delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (41V) и *L. plantarum* (44V, 47V) проявяват изразена антиоксидантна активност (**Фиг. 3**). След 24 часа, обезцветените зони се разширяват с по-размити граници. Осем от изследваните щамове (K8, 5V, 12V, 25V, 40V, 44V, 47V, 48V) показват най-висока антиоксидантна активност със зона на обезцветяване от 15 мм (**Табл. 5**).

Според Atanasov et al. (2019), по-ниско pH на CFS е свързано с по-висока антиоксидантна способност. Те установяват, че щамове като *L. fermentum* TC 3-11 (pH 3. 72), *L. delbrueckii* subsp. *sunkii* VG 1 (pH 3. 42) и *L. rhamnosus* NA 1-8 (pH 3. 60) проявяват добре изразена антиоксидантна активност в интервала между 30-тата минута и 4-тия час. В нашето изследване, при 22 % от щамове МКБ е отчетена умерена антиоксидантна активност като зоните на обезцветяване варират от 6 до 10 мм. При 36% от всички изследвани CFS е установена слаба, но налична антиоксидантна активност като при тях зоните са в границата от 1 до 5 мм. С най-ниска активност и зона от едва 1мм е отчетен щам K4 (*L. brevis*) изолиран от кефир.

Съгласно Hanchi et al. (2022), разработеният $KMnO_4$ агар-метод е подходящ за предварителен скрининг на антиоксидантната активност на МКБ,

тъй като е линеен, точен и възпроизводим в интервал от 30 минути до 4 часа. Въпреки че този метод предоставя обща оценка на антиоксидантната активност, по-задълбочено разбиране може да се постигне чрез специфични тестове за улавяне на свободни радикали (напр. DPPH, ABTS, реакция на Фентон). Такива допълнителни изследвания са планирани за бъдеща оценка на изолираните щамове, като $KMnO_4$-агаровият метод служи като начален инструмент за скрининг.



Фигура 3. *Обезцветени зони получени в резултат на антиоксидантната активност на изследваните щамове млечнокисели бактерии.*

Таблица 5. *Антиоксидантен капацитет на избрани щамове млечнокисели бактери=и.*

АНТИОКСИДАНТЕН КАПАЦИТЕТ, (ММ)											
Щам	**10 мин.**	**30 мин.**	**1 ч.**	**4 ч.**	**24 ч.**	***Щам***	**10 мин.**	**30 мин.**	**1ч.**	**4 ч.**	**24 ч.**
3V	3	4	4	6	14	*33V*	3	4	3	7	14
4V	2	3	3	7	14	*43V*	1	4	3	7	13
5V	1	5	4	7	15	*42V*	2	4	4	7	14
9V	3	4	3	7	13	*47V*	2	4	5	8	15
11V	3	4	3	5	12	*37V*	3	4	3	7	13
12V	3	4	3	7	15	*38V*	3	4	3	6	12
14V	1	4	3	7	14	*40V*	3	4	4	7	15
16V	1	2	3	5	10	*41V*	2	3	3	6	13
17V	3	3	3	7	13	*48V*	2	4	3	7	15
18V	3	4	3	7	10	*50V*	3	3	3	7	15
21V	3	5	4	7	13	*39V*	1	3	2	4	11
23V	1	4	4	7	13	*46V*	1	4	3	6	10
25V	1	4	4	7	15	*K7*	1	3	3	6	12
29V	2	3	2	4	10	*K8*	2	3	3	7	15
32V	2	4	3	7	13	*FC1*	3	3	4	7	14

2.3 Определяне на способността за продукция на водороден пероксид (H_2O_2).

Антимикробните свойства на млечнокиселите бактерии се основават на тяхната способност да синтезират органични киселини, въглероден диоксид и специфични антимикробни вещества (Tsugkiev, 2018). Способността на изследваните МКБ да продуцират водороден пероксид е определена по метода описан в раздел „Материали и методи“. В зависимост от интензивността на синьото оцветяване щамовете са разпределени в три групи. Силна продукция (++) на H_2O_2 е установена при 24 % от всички тествани изолати, като около техните колонии се образуват интензивно оцветени сини зони (**Табл. 6А, Табл. 6Б**). Умерена продукция (+) е наблюдавана при 34 % от млечнокиселите бактерии. При тази група изолати е наблюдавано по-слабо, но все пак видимо оцветяване. При 41 % от щамовете не е установена способност да продуцират водороден пероксид, тъй като около техните колонии не е отчетена промяна в цвета на средата.

Сходни с нашите резултати получават Ren et al. (2014), които изследват девет щама МКБ. Три от тях са силни продуценти на H_2O_2, три са умерени, а останалите се проявяват като слаби. Получените резултати частично съвпадат с вече описаните резултати от антимикробната активност на нативните безклетъчни супернатанти (NCFS) на някои от изолираните щамове срещу *S.* Enteritidis и *E. coli*. Например, при три щама изолирани от кисело зеле (S4, S5 и S14) антибактериална активност срещу *E. coli*, вероятно се дължи на способността им да продуцират водороден пероксид в големи количества. Изненадващо, представителите на род *Lactobacillus* показват различни резултати относно продукцията на водороден пероксид. Щамовете, изолирани от сирене и извара (WC1, WC2, WC3, WC4, WC5, I4) показват умерено позитивен резултат, но не проявяват антагонизъм към нито един от тест микроорганизмите. Докато щам 41V, изолиран от кърма, е отрицателен по продукцията на H_2O_2, но нативната му супернатанта има антимикробна активност към три тест-култури.

Таблица 6А. *Способност на МКБ да продуцират водороден пероксид.*

Продукция на водороден пероксид (H_2O_2)	
Сила на степента на реакция	**Щам**
Силно позитивен резултат (++)	3V, 4V, 5V, 6V, 11V, 12V, 14V, 17V, 19V, 21V, 22V, 23V, S2, S3, S4, S5, S14, S16, FGT2, FGT3, FGT4, FC2, FC3.
Умерено позитивен резултат (+)	25V, 38V, 39V, 44V, K1, K2, K3, K4, K5, K6, K7, K8, I1, I2, I4, I5, WC1, WC2, WC3, WC4, WC5, WC6, S1, S6, S7, S7', S8, S9, S10, S11, S12, S13, S15.
Отрицателен резултат (-)	1V,2V,7V,8V,9V,10V,13V,15V,16V,20V,24V,26V,27V,28V,29V,30V, 31V, 32V,33V,34V,36V,37V,43V, 44V,50V,46V,47V,49V,40V, 45V, 41V, 48V, FC1, FC4, FGT1, I3, I6.

Таблица 6Б. *Способност на МКБ да продуцират водороден пероксид.*

Степен на сила на реакция	*Брой щамове*	*Процентно съотношение %*
Силно позитивен резултат	23	24 %
Умерено позитивен резултат	32	34 %
Отрицателен резултат	39	41 %

2.4 Изследване на агрегационната способност.

Адхезията и агрегацията са характерни свойства на пробиотичните щамове от семейство *Lactobacillaceae* (Zawistowska-Rojek *et al.*, 2022). Адхезивният потенциал на щамовете е тясно свързан с тяхната склонност към авто-агрегация и ко-агрегация – основаващ се на способността им да се групират със собствения им вид или с други микробни видове (Hojjati *et al.*, 2020).

2.4.1 Авто-агрегационна способност.

За да бъде оценен авто-агрегационния потенциал на създадената колекция от щамове, всички млечнокисели изолати са изследвани по методиката описана в раздел „Материали и методи“. Резултатите са отчетени на 4-тия и 24-тия час от провеждането на експеримента. При изолатите от различни ферментирали зеленчукови и млечни продукти, най-високи стойности на авто-агрегация към 4-тия час, са отчетени при два щама - *L. koreensis* FC4 (48 %) и *L. brevis* S2 (44 %). Щамове (S8, WC6, I1и I2), идентифицирани като *L. plantarum*, също показват много добра способност да авто-агрегират, като още на 4-тия час над 40 % от бактериалните клетки авто-агрегират помежду си (**Фиг. 4**). Най-слаб авто-агрегационен капацитет е отчетен при два щама от род *Lactobacillus,*

изолирани от бяло саламурено сирене - WC4 (8 %) и WC5 (11 %), определени като *L. helveticus*. Процентът на авто-агрегация при останалите изолати варира от 15 до 25 %.

С напредване на инкубационния период способността на щамовете да авто-агрегират нараства и на 24-тия час достига стойности между 29 и 77 %. Най-висока способност да авто-агрегират демонстрират няколко щама – *L. koreensis* FGT2 (77 %), *L. plantarum* S13 (76 %) и FC1 (76 %), *L. helveticus* WC2 (72 %) и *L. brevis* K7 (71 %). Интересен факт е, че при FC1 и WC2 е отчетена ниска стойност на авто-агрегация към 4-тия час от експеримента – само 18 %. Любопитно е също, че двата щама с най-висок процент на авто-агрегация на 4-тия час (S2 и FC4) не запазват високата си стойност на 24-тия час (съответно 63 % и 68%).

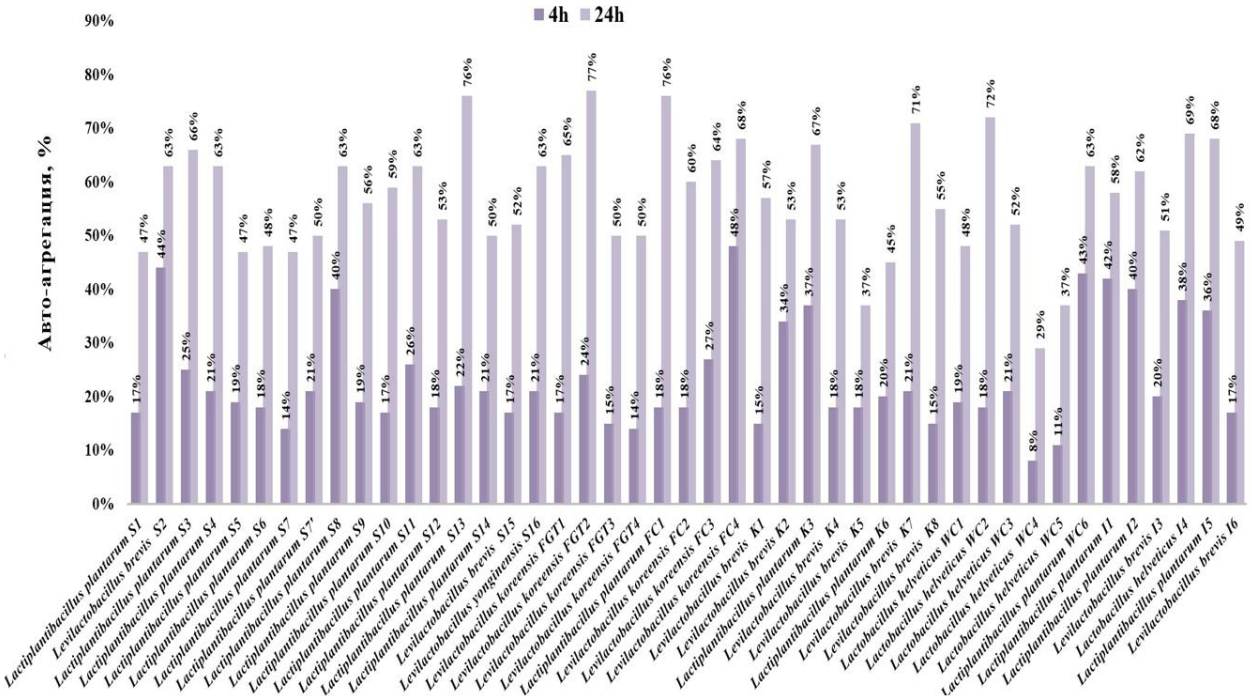
Общо петнадесет изолата (S2, S3, S4, S8, S11, S16, FGT1, FC2, FC3, FC4, K3, WC6, I2, I4 и I5) демонстрират авто-агрегационен капацитет над 60 % към 24-тия час.

Все още няма универсална скала за определяне степента на авто-агрегация, но обикновено се приема, че стойности над 35-40 % са показателни за добър агрегационен потенциал (Bouchard *et al*., 2015). Описаните в литература данни показват, че представителите на един вид могат да имат силно щамово-специфичен авто-агрегационен капацитет. Например, два щама *L. plantarum*, изолирани при процес на ферментация на какао, показват стойности от 18 % и 20 % (Ramos *et al*., 2013). Щам на *L. plantarum*, изолиран от зеленчуци – 34 % (Ren *et al*., 2014). При сравнение с тези резултати, изследваните от нас щамове *L. plantarum* проявяват по-добър авто-агрегационен капацитет, сходен с този, описан от Hoxha et al. (2023). Например, трите щама *L. plantarum*, изолирани от бяло саламурено сирене и извара (WC6, I1 и I2), демонстрират висок авто-агрегационен капацитет както на 4-ия (43 %, 42 % и 40 %), така и на 24-ия час (63 %, 58 % и 62 %). При седем щама *L. fermentum*, изолирани от ферментирали китайски продукти, са отчетени силно вариращи стойности – от 0, 86 % до 65,15 % (Li *et al.,* 2015). Ren et al. (2014) откриват високи стойности само при

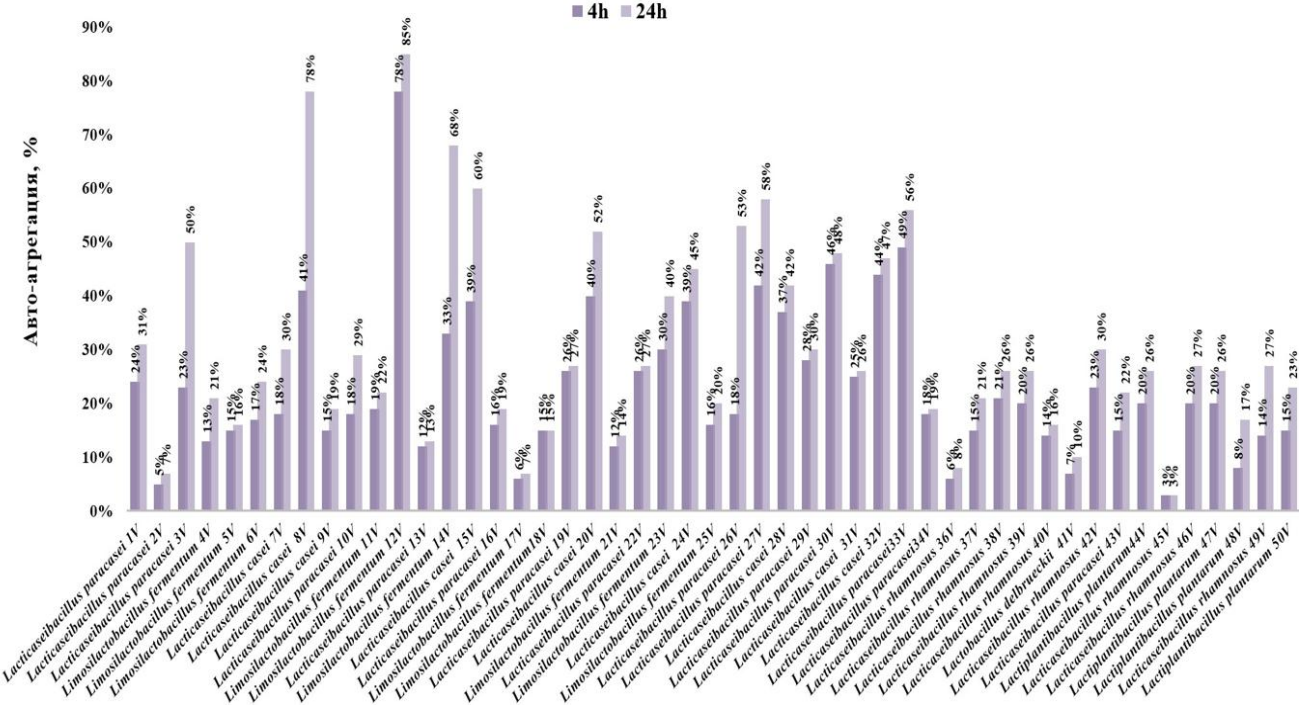
Ligilactobacillus salivarius subp. *salicinius* CICC 23174 (46 %) и *L. acidophilus* CGMCC 1. 1854 (45 %), спрямо референтния щам *L. rhamnosus* LGG (33 %).

Получените от нас резултати потвърждават вече публикувани данни, че авто-агрегационната способност е по-скоро щамово-специфична и значително варира дори в рамките на един и същи вид. Това наблюдение се потвърждава и от данните на представителите на род *Lactobacillus*. Петте щама *L. helveticus* (W1, W2, W3, W4, W5) показват ниска агрегационна способност на 4-ия час, но на 24-ия час се разделят в две групи. Щамове W1, W2, W3 достигат високи стойности на автоагрегация - 48,72 и 52 % съответно, докато щамове W4, W5 достигат едва 29 и 37 %, съответно.

На **Фиг. 5** са представени резултатите на агрегационния потенциал на изолираните от майчина кърма и фецес щамове. Сред изследваните лактобацили, 27 % демонстрират висок капацитет на авто-агрегация - над 40 %. Най-висок процент на авто-агрегация е отчетен при два щама: *L. casei* 8V (78 %) и *L. fermentum* 12V (85 %) на 24-тия час от инкубацията. Най-слаб авто-агрегационен капацитет е установен при *L. paracasei* 2V (5%) и *L. rhamnosus* 45V (13%) на 4-тия час. Щам *L.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* се позиционира в групата на изолатите със слаба автоагрегация (7% и 10%, съответно на 4-ия и 24-ия час). Щамовете от вида *L. fermentum* също се различават значително в авто-агрегационния си капацитет, който варира от 7 % до 85 %. Интересно е, че шест щама на *L. casei* демонстрират висока авто-агрегационна способност от над 40 %. При останалите изследвани млечнокисели изолати стойностите варират между 12 % и 68 %. Това отново потвърждава, нашите наблюдения, че авто-агрегационната способност е строго щамово-специфично свойство, дори и при представители на един и същи вид. Лактобацилни щамове, изследвани от Gomaa (2013), демонстрират отличен авто-агрегационен капацитет (между 51 % и 78 %) още на 5-тия час от инкубацията. Високи нива на авто-агрегация са докладвани и при щамове на *L. casei* и *L. fermentum* – в диапазона от 61 % до 96 % (de Souza *et al*., 2019).



Фигура 4. *Авто-агрегационен капацитет на МКБ изолирани от ферментирали храни с различен произход, измерен на 4-ти и 24-ти час.*



Фигура 5. *Авто-агрегационен капацитет на МКБ изолирани от майчина кърма и фецес, измерен на 4-ти и 24-ти час.*

2.4.2 Ко-агрегационна способност.

В настоящия дисертационен труд е оценена ко-агрегационната способност на изследваните щамове млечнокисели бактерии спрямо четири вида патогенни бактерии и един вид патогенни дрожди: *E. coli*, *S.* Enteritidis, *L. innocua*, *S. aureus* и *C. albicans*.

Подобно на оценката на авто-агрегационния потенциал при млечнокиселите бактерии, все още не съществува единна, общоприета скала за определяне на степента на ко-агрегационната способност спрямо конкретни патогени. Поради това, въз основа на получените от нас резултати, в хода на изследването, е направена предварителна класификация на процентите ко-агрегация, на базата която, МКБ са разделени в три групи: слаби ко-агрегатори (ко-агрегират с патогена до 20 %); умерени ко-агрегатори (между 21 % и 40 %) и силни ко-агрегатори (проявяват ко-агрегационен капацитет над 41 %).

При взаимодействието между изследваните лактобацили и *S.* Enteritidis, най-високата степен на ко-агрегация е отчетена при щам *L. casei* 8V (43 %) на 4-тия час от протичането на експеримента (**Фиг. 6А**). От друга страна, осем щама (17V, 28V, 30V, 34V, 40V, 42V, 44V и 46V) демонстрират ниска ко-агрегационна активност (под 10 %) на същия етап, като при тях не е наблюдавано значително повишение на ко-агрегацията дори след 24-ия час от инкубирането. При останалите изследвани изолати е отчетена по-висока ко-агрегационна способност в рамките на 24 часа - от 10 % до 45 %. Най-висока ко-агрегационна способност (51 %) в края на експеримента демонстрира щам *L. paracasei* 10V. Според предложената от нас предварителна скала, 66 % от всички изследвани млечнокисели бактерии се класифицират като слаби ко-агрегатори спрямо *S.* Enteritidis, 30 % като умерени, а само 4 % (*L. casei* 8V и *L. paracasei* 10V) като силни ко-агрегатори.

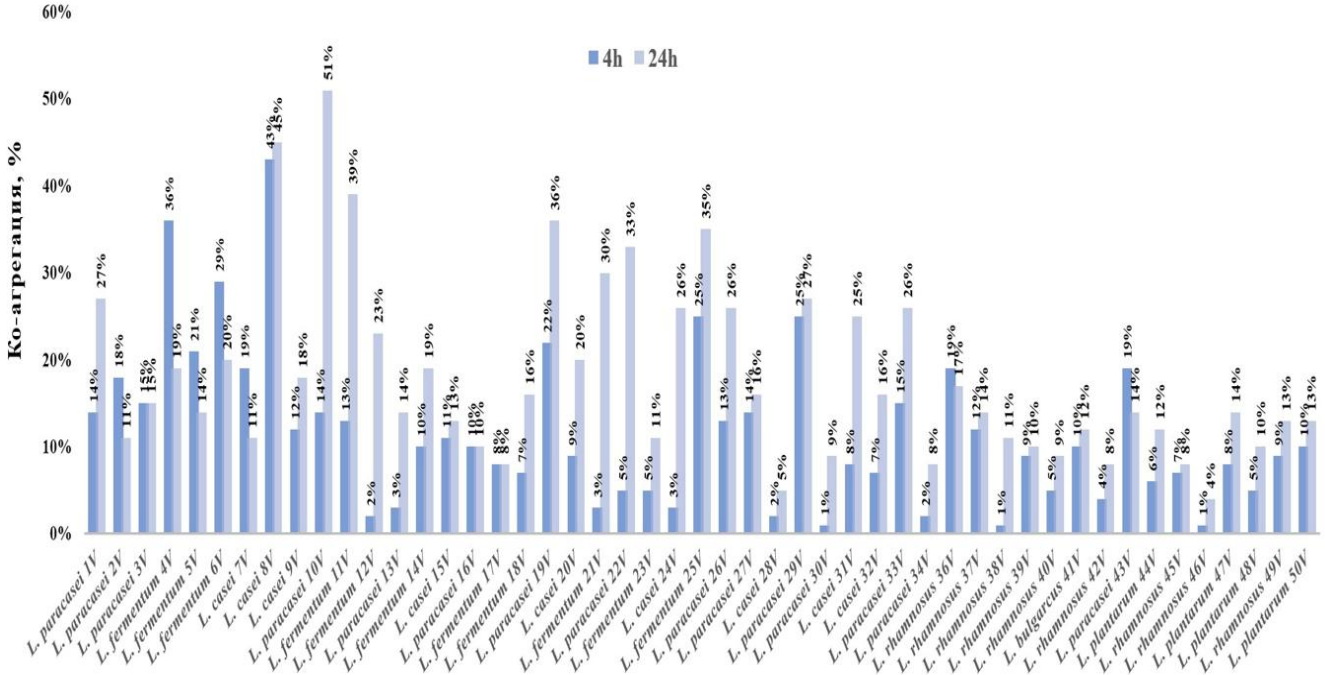
Всички изследвани щамове на *L. paracasei* проявяват щамово специфична ко-агрегационна способност с този патоген, вариращa между 8% и 51% в хода на експеримента. При всички щамове, принадлежащи към вида *L.*

plantarum, е отчетен нисък ко-агрегационен капацитет спрямо *S.* Enteritidis, в границите от 5 % до 14 % както на 4-тия, така и на 24-тия час. *L.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* също се отнася към групата на слабите ко-агрегатори (10% и 12%, съответно). В други проучвания се съобщава, че ко-агрегацията между млечнокисели бактерии и патогенни микроорганизми като *S.* Typhimurium, *S. aureus* и *E. coli* варира между 10 % и 30 % на 4-тия час, като впоследствие значително се повишава до 24-тия час (Li *et al*., 2020). Ко-агрегационният капацитет на пет щама лактобацили (*L. plantarum* 83 и 114 и *L. kefir* 8321, 83 и 113), изолирани от кефирени зърна спрямо *Salmonella*, също се оказва силно променлив и строго зависим от конкретния щам (Merino *et al*., 2019).

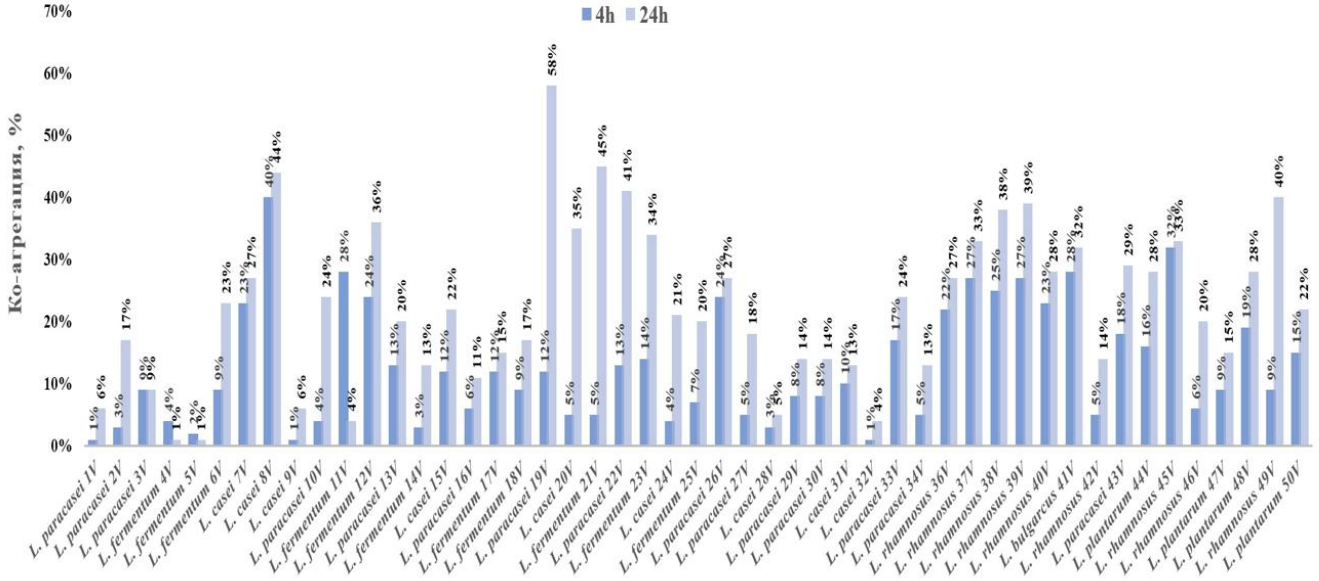
Най-висок процент на ко-агрегация с *E. coli* е отчетен при два от изследваните млечнокисели изолати: *L. casei* 8V (40 %) на 4-тия час и *L. paracasei* 19V (58 %) на 24-тия час (**Фиг. 6Б**). Според резултатите, 14 % от всички тествани щамове демонстрират слаба ко-агрегационна способност с *E. coli* (под 10 %) след 24 часа инкубация. Разнообразието в отчетените проценти на ко-агрегация при щамовете на *L. paracasei* с *E. coli* – от най-ниската стойност 6 % при щам 1V до най-високата от 58 % при щам 19V – показва, че тази активност вероятно отново се дължи на строга щамова-специфичност.

Според проучването на Sophatha et al. (2020), ко-агрегацията на щамове *Lactobacillus* с патогени като ентеротоксигенна и неентеротоксигенна *E.coli*, както и *S. enterica*, след 24 часа инкубация, варира между 35 % и 66 %. В друго изследване ко-агрегацията на различни щамове от семейство *Lactobacillaceae* с *E.coli* O157:H7 след 5 часа инкубация достига между 21 % и 32 % (Piwat & Teanpaisan, 2015). Някои автори подчертават, че ко-агрегационнните способности на млечнокиселите бактерии са зависими както от техния авто-агрегационен потенциал, така и от продължителността на инкубация (Karbowiak *et al*., 2022).

Според предложената от нас предварителна скала, 44 % от изследваните щамове се класифицират като слаби ко-агрегатори с *E.coli,* 48 % - демонстрират умерена способност да ко-агрегират, а 8 % - се отличават като силни ко-агрегатори. Впечатляващо е, че щамът 8V (*L. casei*) показва висока ко-агрегационна активност (над 40 %) както с *E. coli*, така и със *Salmonella*, което подчертава неговия потенциал като пробиотичен щам, проявяващ антагонистична активност срещу патогенни видове бактерии.



Фигура 6А. *Ко-агрегационна способност на изследваните щамове МКБ със Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. *Enteritidis* ATCC 13076*, измерена на 4-ти и 24-ти час.*



Фигура 6Б. *Ко-агрегационна способност на изследваните щамове МКБ с E. coli* ATCC 25922*, измерена на 4-ти и 24-ти час.*

Наблюдаваната тенденция за слаба ко-агрегационна способност на изследваните щамове млечнокисели бактерии с двата Грам-отрицателни тест-микроорганизми се потвърждава и при Грам-положителните *L. innocua* и *S. aureus*.

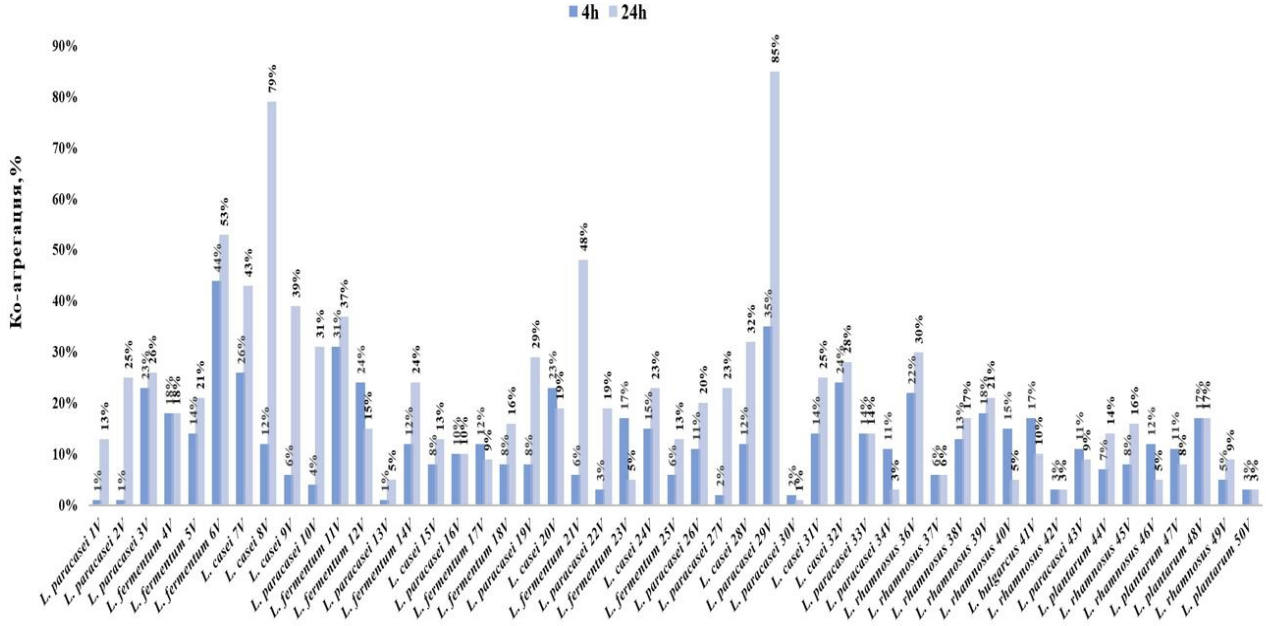
При *L. innocua*, 54 % от щамовете демонстрират слаба ко-агрегационна способност, като тази ниска активност се запазва както на 4-тия, така и на 24-тия час от провеждането на експеримента. Шест изолата - *L. paracasei* 13V и 30V, *L. rhamnosus* 37V, 42V и 49V, и *L. plantarum* 50V – показват най-ниските стойности на ко-агрегационна активност, под 10 % (**Фиг. 6В**). *L.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* също попада в групата на слабите ко-агрегатори (17 % и 10 %). Умерена способност за ко-агрегация с *L. innocua* е наблюдавана при 36 % от изследваните млечнокисели изолати, а силна способност за ко-агрегиране е отчетена едва при 10 %. Най-висок процент на ко-агрегиране е отчетен при *L. paracasei* 29V (85 %) на 24-тия час. Също така, *L. casei* 8V отново потвърждава своя висок ко-агрегационен потенциал, като е отчетена 79 % на ко-агрегация с *L. innocua* на 24-тия час. Други три силни ко-агрегатора, с резултат над 40 % са щамовете *L. fermentum* 6V и 21V и *L. casei* 7V.

Някои автори посочват, че колкото по-дълго МКБ и патогенните клетки са в контакт, толкова по-висока е ко-агрегационната активност. Например, при *L. plantarum* 4-10 е наблюдаван слаб процент на ко-агрегация с *L. monocytogenes*, през първите два часа, но активността нараства значително с времето, което предполага прогресивно взаимодействие между двата вида (Yang *et al*., 2024).

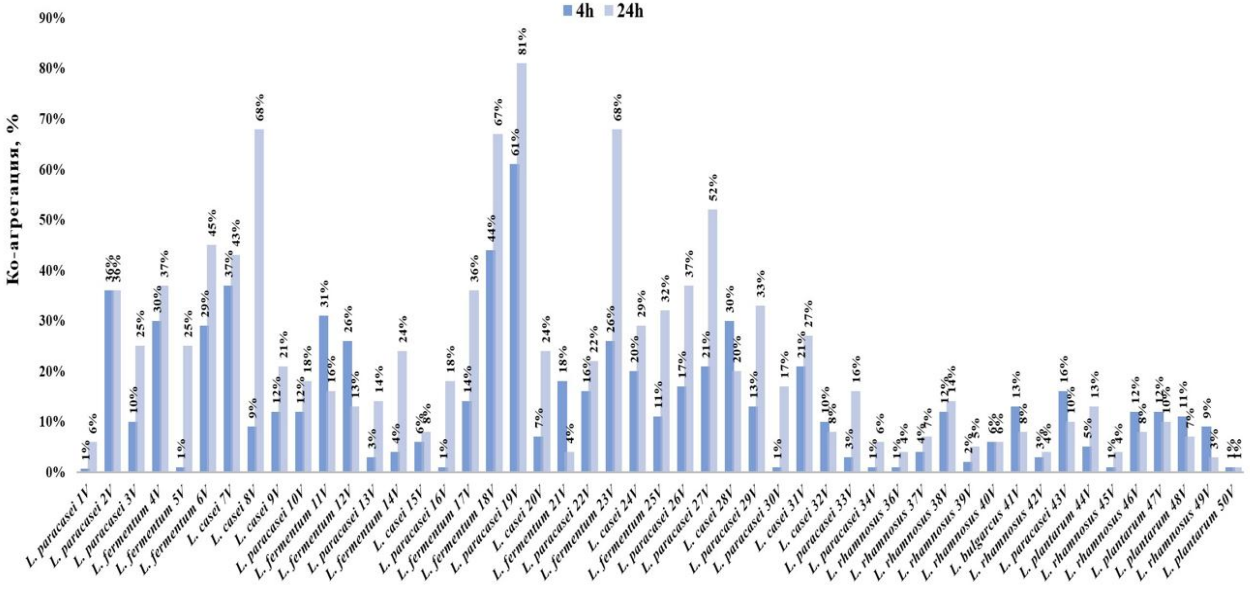
При анализирането на резултатите от ко-агрегацията между изследваните млечнокисели щамове и *S. aureus* е установено, че приблизително 50 % от изолатите са слаби ко-агрегатори. Най-ниска активност (1-4 %) е регистрирана при щамовете 36V, 45V и 50V. В групата на силните ко-агрегатори попадат седем изолата (14 %) от три различни вида: *L. fermentum* (6V, 18V и 23V), *L. paracasei* (19V и 27V) и *L. casei* (7V и 8V). При два от тях – 18V и 19V – се наблюдава ко-агрегационна активност над 40 % още на 4-тия час (**Фиг. 6Г**). На

24-тия час *L.paracasei* 19V достига 81 % на ко-агрегиране със *S. aureus*. Интересен е и резултатът на *L. casei* 8V, който първоначално демонстрира по-ниска ко-агрегационна активност (9 %) на 4-тия час, но до 24-тия час увеличава активността си до 68 %, което потвърждава неговия силен ко-агрегационен капацитет.

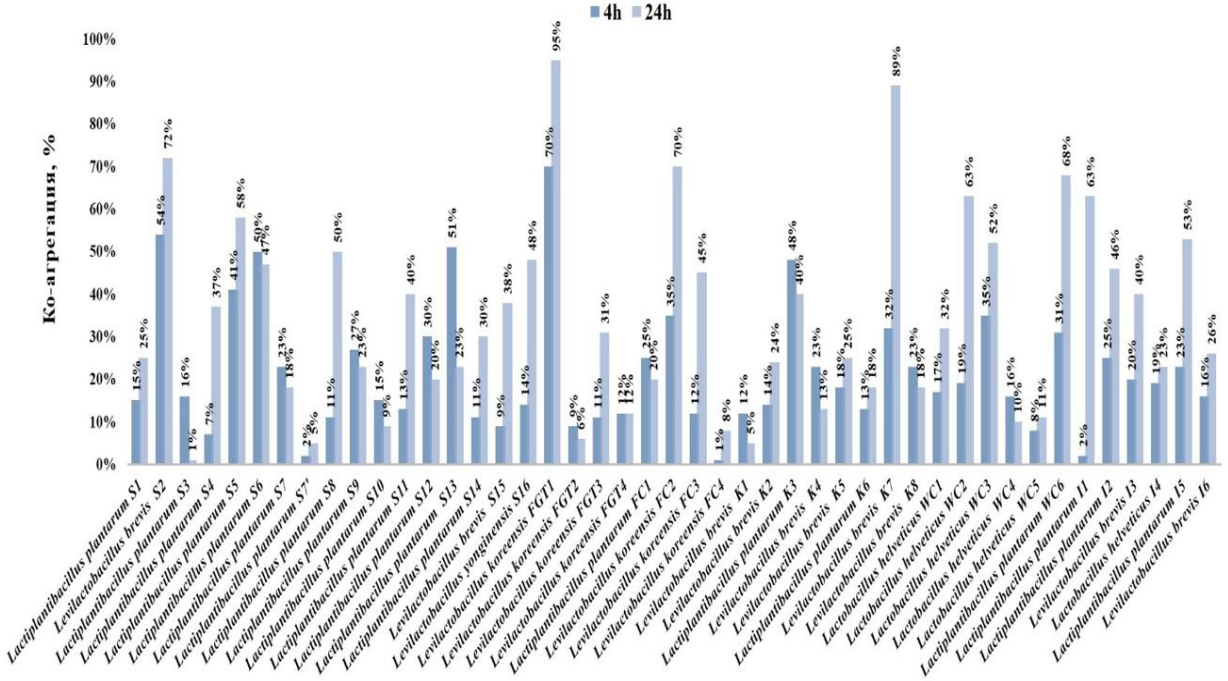
В изследваната популация от млечнокисели бактерии четири щама се отличават с най-висок процент на ко-агрегация с патогенната *C. albicans* на 4-тия час от провеждането на експеримента - FGT1 (70 %), S2 (54 %), S13 (51%) и S6 (50 %). На 24-тия час най-високи стойности на ко-агрегационен капацитет са отчетени при FGT1 (95 %), K7 (89 %), S2 (72 %) и FC2 (70 %) (**Фиг. 6Д**). Тези резултати демонстрират, че щамът *L. koreensis* FGT1 притежава значителен потенциал за пробиотично приложение по този критерий. При два щама на *L. plantarum* – WC6 (68 %) и I1 (63 %), изолирани от различни млечни продукти (бяла саламурено сирене и извара), също е отчетен висок процент на ко-агрегиране към 24-тия час. При щамовете от род *Lactobacillus, L. helveticus* WG2 и WG3 е установено висока ко-агрегация на 24-ия час (63% и 52%, съответно). Наблюдаваната висока ко-агрегационна способност на изследваните изолати може да се дължи на специфично взаймодеиствие между повърхностните структури на МКБ и тези на патогена. В процентно отношение, на база ко-агрегационната способност в изследваната група МКБ, 29 % от изолатите се явяват като слаби ко-агрегатори спрямо *C. albicans*, 38 % са отличени като щамове с умерена способност, а 33 % се причисляват към групата на силните ко-агрегатори, като при тях е отчетен висок процент (над 41%) на ко-агрегиране. Подобни резултати са установени и от Mastromarino et al. (2002), които описват ефективна ко-агрегация на *L. salivarius* и *Lactobacillus gasseri* с *Gardnerella vaginalis*. Освен това, в други изследвания щамове на *L.fermentum* и *L. plantarum*, изолирани в процеса на ферментация на какао, успешно ко-агрегират с *E. coli, Shigella flexneri, S. enterica, L. monocytogenes* и *S. aureus* (Ramos *et al*., 2013; Santos *et al*., 2016).



Фигура 6В. *Ко-агрегационна способност на изследваните щамове МКБ с L. innocua* SLCC 3379 ATCC 33090*, измерена на 4-ти и 24-ти час.*



Фигура 6Г. *Ко-агрегационна способност на изследваните щамове МКБ с S. aureus* ATCC 6538, *измерена на 4-ти и 24-ти час.*



Фигура 6Д. *Ко-агрегационна способност на изследваните щамове МКБ с Candida albicans* ATCC 10231*, измерена на 4-ти и 24-ти час*

2.5 Изследване на адхезионната способност на лактобацилите.

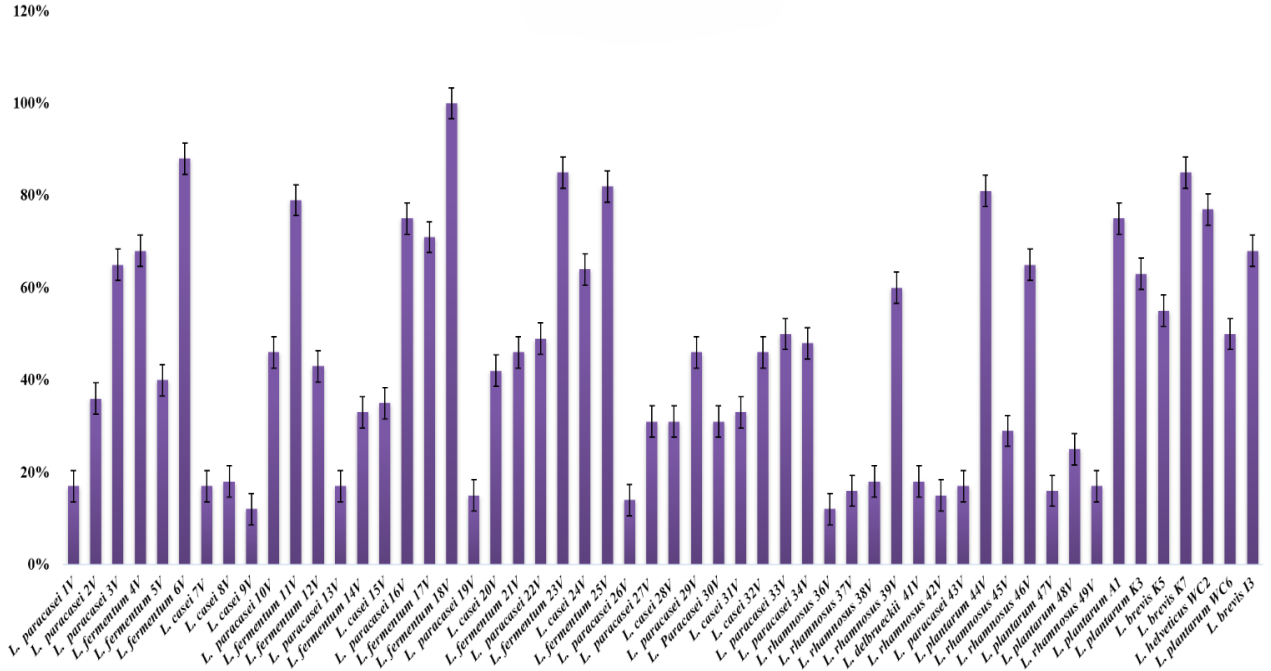
2.5.1 Формиране на биофилм.

Бактериалните биофилми са важен елемент за разбиране на механизмите, чрез които бактериите се адаптират към стресовите условия на околната среда и колонизират различни екологични ниши. Биофилмите, образувани от МКБ, действат като защитна бариера, която възпрепятства прилепването на патогенни микроорганизми към мукозните повърхности (Tatsaporn & Kornkanok, 2020).

За да бъде изследвана способността на колекцията от щамове МКБ, да образуват биофилми, всички изолати са култивирани в 96-ямкови плаки за 24 часа. Всички изследвани щамове демонстрират способност за формиране на биофилми, но в различна степен (**Фиг. 7**). Изключение правят 8 % от изолатите (S2, S3, S4, S6, S7, S7', S8, S14), при които не е отчетен резултат, отразяващ способността им за формиране на биофилми. Останалите щамове се групират, както следва: Слаби производители на биофилм - 24 % от щамовете (1V, 7V, 8V, 9V,13V, 19V, 26V, 36V, 37V, 38V, 40V, 41V, 42V, 43V, 47V, 49V, 50V, K2, K4, K8, S11, S12, S15). Като умерени или средни по сила производители на биофилм се отличават 42 % от изолатите (2V, 5V, 10V, 12V, 14V, 15V, 20V, 21V, 22V, 29V, 30V, 31V, 32V, 34V, 45V, 48V, S5, S9, S10, S13, S16, K1, K6, WC1,WC3, WC4, WC5, I1, I2, I4, I5, I6, FC1, FC2, FC3, FC4, FGT1, FGT2, FGT3, FGT4). В групата на силните производители на биофилм попадат 24 % от всички изследвани щамове (3V, 4V, 6V, 11V, 16V, 17V, 18V, 23V, 24V, 25V, 27V, 28V, 33V, 39V, 44V, 46V, S1, K3, K5, K7, WC2, WC6, I3).

Впечатление правят пет щама (6V, 23V, 25V, 44V и K7), които демонстрират способност да формират биофилм над 80 %, като *L. fermentum* 18V е с най-висока активност - 100%. Резултатите сочат значителни разлики в способността за биофилм образуване дори между щамове от един и същи вид. Например, при единадесетте щама на *L. fermentum*, продуктивността варира между 40 % и 100 %. По същия начин трите изследвани щама на *L. paracasei* показват различни нива

на биофилм образуване: щам 13V (17 %) е слаб производител, 2V (36 %) - среден, а 16V (75 %) попада в групата на силните производители на биофилм. Това потвърждава, че способността за биофилм образуване е строго щам-специфична. Получените от нас резултати са в съответствие с наблюденията на Kubota et al. (2008), за *L. plantarum* и *L. brevis*. В друго проучване, четири щама на *L. fermentum* демонстрират капацитет за формиране на биофилм в диапазона от 36 % до 83 %, което подсказва, че тази способност може да бъде повлияна от фактори на средата и микробното обкръжение (Atanasov *et al.*, 2023). Подобни щам-зависими различия са докладвани и от Gomez et al. (2016) при *Lactococcus lactis* и *Lactobacillus curvatus*, както и от Jha et al. (2022), където наблюдаваната вариация е между 19 % и 86 %.



Фигура 7. *Способност на изследваните щамове МКБ да формират биофилм.*

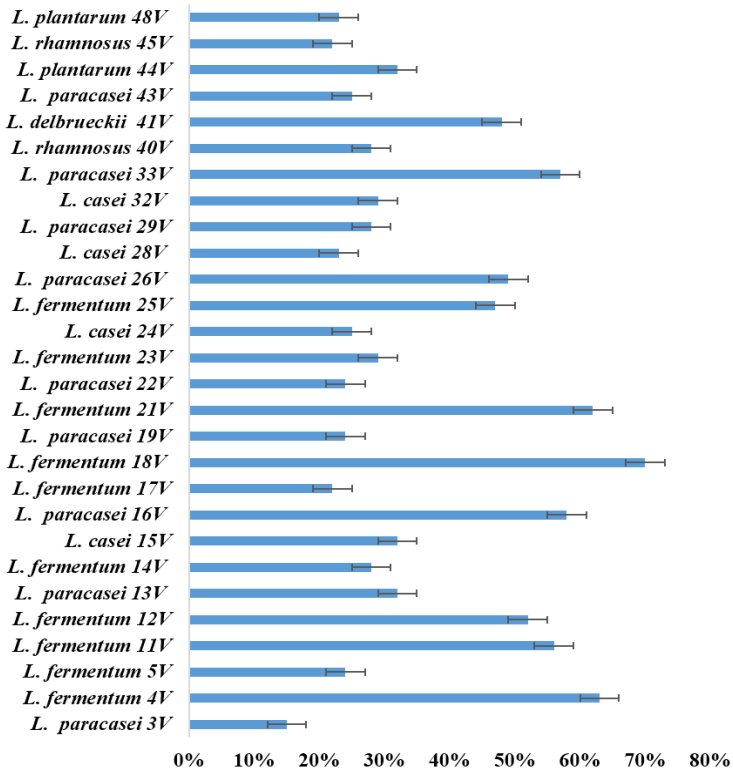
2.5.2 Формиране на анти-биофилм вещества срещу патогенни тест-микроорганизми.

Като допълнителен и по-задълбочен анализ на способността за формиране на биофилми на изследваните от нас млечнокисели бактерии е направен тест, чрез които се проследява възможността на щамовете да продуцират анти-биофим вещества, които възпрепятстват формирането на биофилми от *P. aeruginosa* и *C. albicans.*

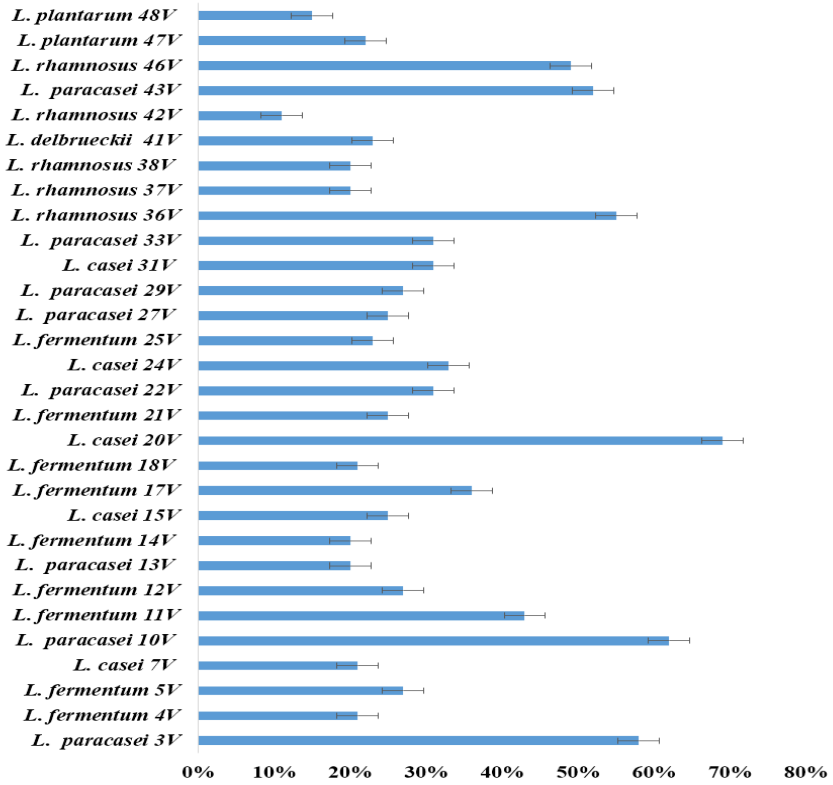
При анализирането на резултатите от проведения експеримент, безклетъчните супернатанти на пет щама *L. fermentum* (4V, 11V, 12V, 18V и 21V), два щама *L. paracasei* (16V и 33V) и един щам *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (41 V), демонстрират спсобност да инхибират над 50 % формирането на биофилм от *P. aeruginosa*. Най-силен ефект е отчетен при щама *L. fermentum* 18V, който потиска биофилм образуването до 70 %. При останалите щамове се наблюдава слабо или липса на действие срещу този патоген (**Фиг. 8А**). Много автори съобщават, че някои МКБ щамове имат способност да инхибират биофилми както на Грам-положителни, така и на Грам-отрицателни бактерии, като тази способност е строго щамово-специфична (Tuo *et al*., 2013). Например Hoseinian et al. (2021), съобщават, че щамове на *L. casei* и *L. plantarum*, изолирани от прясно и кисело мляко, могат да потиснат съответно с 11 % и 13 % биофилма формиран от *P. aeruginosa*. В млечна среда *L. plantarum* показва най-висок процент на инхибиране (26 %), докато *L. casei* достига до 16 %. Получените от нас резултати съвпадат с наблюденията от две аржентински проучвания, в които щамове на *L. casei, L. acidophilus* и *L. plantarum* също потискат формирането на биофилми от *P. aeruginosa* (Asadzadegan *et al*., 2023).

Част от изследваните изолати проявяват анти-биофилмна активност срещу *C. albicans*. (**Фиг. 8Б**). Само пет щама (3V, 10V, 20V, 36V и 43V) демонстрират инхибиране на биофима над 50 %. Най-силна активност срещу *C. albicans* показва щам *L. casei* 20V (69 %). При останалите изолати отново се наблюдава слаба или липсваща активност. Тези резултати още веднъж потвърждават, че

производството на вещества с анти-биофилмна активност е строго щамово-специфична характеристика. Подобни данни са докладвани и в други изследвания, например, клетъчни филтрати на *L. acidophilus* 8MR7 и *L. paracasei* subsp. *paracasei* 10MR8 също инхибират формирането на биофилми от видове *Candida* (Kıvanç & Er, 2020).). Освен това, органични киселини като млечна киселина и водороден пероксид, секретирани от щамове на МКБ, допълнително благоприятства потискането на растежа на *C. albicans*. Gudiña et al. (2010), съобщават, че способността на *L. acidophilus* и *L. paracasei* subsp. *paracasei* A20 да инхибират прилепването на *Candida* е ниска, което е в съответствие с нашите наблюдения.



Фигура 8А. *Анти-биофилмна активност на изследваните МКБ срещу P. aeruginosa ATCC 3732.*



Фигура 8Б. *Анти-биофилмна активност на изследваните МКБ срещу Candida albicans ATCC 10231.*

2.6 Определяне способността на МКБ да адхезират към имобилизиран муцин.

Изследването на адхезията на лактобацилни щамове към фиксиран (имобилизиран) муцин предоставя ценна информация относно тяхната способност да конкурират и възпрепятстват адхезията на патогенни микроорганизми. Все още обаче механизмите, по които пробиотичните бактерии взаимодействат с компонентите на муцина, не са напълно изяснени. По-доброто разбиране на факторите, участващи в повърхностната адхезия на различни видове

млечнокисели бактерии, може да даде яснота относно самия механизъм на свързване (Zacarías *et al*., 2019).

2.6.1 Изследване на способността на МКБ да адхезират към имобилизиран върху плаки муцин.

В настоящото изследване е оценена способността на девет от изследваните млечнокисели изолата, подбрани въз основа на по-горе вече описаните анализи, да адхезират към имобилизиран в полистиролни плаки муцин. Получените резултати отразяват различна степен на адхезия на отделните щамове към муцина. Броят на прикрепените клетки варира от 10^1 до 10^6 CFU/mL (**Табл. 7**). Емпирично е доказано, че жизнеспособността на млечнокиселите бактерии не е повлияна от обработката на клетките с Triton-X-100 дори след 30-минутна инкубация при 37°C.

Най-силна адхезия към муцина демонстрира щамът *L. koreensis* FGT2 (1.9 x 10^6 CFU/mL). Впечатление прави, че степента на прикрепване се различава както между отделните видове, така и между щамове от един и същи вид (**Табл. 7**). Например, трите щама *L. rhamnosus* (37V, 39V и 46V) показват различна адхезионна способност, като 39V и 46V се прикрепват по-ефективно от 37V. Подобно на тези резултати, от двата щама на *L. plantarum,* 47V се отличава с по-висока степен на адхезия спрямо щам 48V. Много ниска стойност на адхезия към муцина също така е отчетена при щам *L. fermentum* 18V, въпреки добрите резултати, които дава при изследването на агрегационната му способност. В друго изследване, проведено от Dhanani и Bagchi, (2013), също са установени различия в адхезията към муцин между различните щамове, които те изследват. Те съобщават, че *L. delbrueckii* и *L. plantarum* адхезират с ефективност, сравнима с тази на референтния пробиотичен щам *L. rhamnosus* GG, който показва най-добри адхезивни свойства. От друга страна, щамовете на *L. fermentum* и *L. casei* демонстрират значително по-ниска способност на адхезия.

Получените от нас резултати в хода на изследването, потвърждават тези наблюдения и подчертават, че способността за адхезия към муцин е строго специфична за конкретния щам, дори в рамките на един и същи вид.

Таблица 7. *Брой жизнеспособни клетки на изследваните МКБ, прикрепени към муцин.*

Щам	Брой клетки прикрепени към муцин, CFU/ mL
L. fermentum 18V	$8.3 \times 10^1 \pm 0.53$
L. rhamnosus 37V	$5.5 \times 10^4 \pm 0.32$
L. rhamnosus 39V	$8.5 \times 10^5 \pm 0.22$
L. delbrueckii subsp. *bulgaricus 41V*	$1.9 \times 10^3 \pm 0.38$
L. paracasei 43V	$5.4 \times 10^3 \pm 0.48$
L. rhamnosus 46V	$1.2 \times 10^5 \pm 0.80$
L. plantarum 47V	$5.5 \times 10^4 \pm 0.43$
L. koreensis FGT2	$1.9 \times 10^6 \pm 0.23$
L. plantarum 48V	$8.1 \times 10^1 \pm 0.36$

Резултатите са изразени като средна стойност (±) стандартно отклонение (SD) от три независими повторения.

2.6.2 Изследване на способността на МКБ да адхезират към имобилизиран муцин в условия на конкурентни отношения с патогенни тест - микроорганизми.

Въз основа на резултатите от предходно описания експеримент, за последващия анализ е селектиран щамът, който демонстрира най-висока адхезионна способност към муцина, а именно *L. koreensis* FGT2. Целта на изследването е да се оцени конкурентната му способност спрямо два от най-разпространените гастроинтестинални патогена - *E.coli* и *S.* Enteritidis. Получените резултати са представени в **Таблица 8**. Данните от **Табл. 8** показват, че *L. koreensis* FGT2 не инхибира адхезията на нито един от двата тест-патогени към муцина. След отделяне на свързаните клетки от повърхността на муциновия слой е установено, че броят на адхезиралите патогенни микроорганизми в ямките (съдържащи както млечнокиселия щам, така и конкретния патоген) остава сходен с този в контролите. Това предполага, че *L. koreensis* FGT2 не е способен ефективно да се прикрепи към муцина в присъствието на патогенни

микроорганизми, и съответно не упражнява конкурентно въздействие върху тяхната адхезия. Подобни наблюдения са докладвани от Dhanani и Bagchi (2013), които изследват конкурентното инхибиране на млечнокисели бактерии спрямо *E.coli* и *S.* Typhi. Авторите също установяват, че щамовете *L. fermentum* Ast1 и *L. casei* Cs5.2 не инхибират адхезията на *E. coli*, но за разлика от *L. koreensis* FGT2, проявяват отчетлив антагонистичен ефект, изразен в ограничаване на прикрепването на *S.* Typhi.

Установените различия в конкурентното инхибиране между изследваните щамове показват, че антагонистичната активност към ентеропатогени е щам-специфична характеристика. Липсата на ефект при *L. koreensis* FGT2 спрямо *E. coli* и *S.* Enteritidis подчертава необходимостта от внимателен подбор на изолати, които притежават стабилен и широкоспектърен пробиотичен потенциал. Практическото значение на тези резултати е свързано със селекцията на щамове с висока конкурентна способност.

Таблица 8. *Конкурентно инхибиране на E. coli и S.* Enteritidis *към муцин в присъствието на МКБ.*

Щам	Брой клетки контрола CFU/ mL	Брой клетки прикрепени към муцин, CFU/ mL
L. koreensis FGT2	1×10^8	$3.6 \times 10^5 \pm 0.43$
E. coli	1×10^8	$2.7 \times 10^5 \pm 0.21$
Salmonella Enteritidis	1×10^8	$2 \times 10^4 \pm 0.36$
FGT2 + *E. coli*	-	$1.3 \times 10^5 \pm 0.23$
FGT2 + *Salmonella* Enteritidis	-	$3 \times 10^4 \pm 0.17$

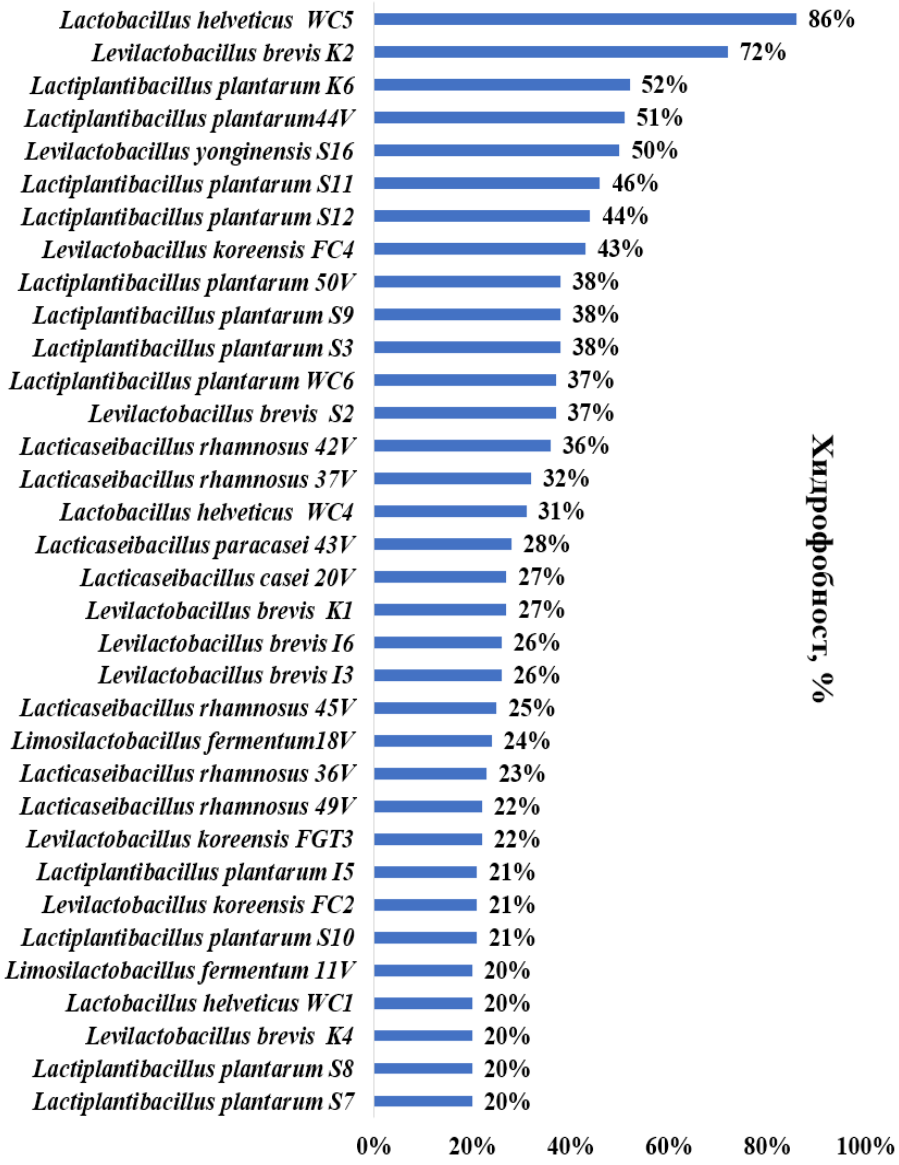
Резултатите са изразени като средна стойност (±) стандартно отклонение (SD) от три независими повторения.

2.7 Изследване на повърхностните характеристики на МКБ - тест за Хидрофобност.

За да се счита, че даден щам на млечнокисела бактерия, е пробиотичен, то той трябва да притежава поне 40 % хидрофобност (Del Re *et al*., 2000). Според този критерий, по-голямата част от тестваните в това изследване млечнокисели изолата не отговарят на изискванията за предполагаеми пробиотични щамове. Въпреки това, 36 % от тях демонстрират над 20 % хидрофобност (**Фиг. 9**).

При осем щама МКБ, е отчетен висок процент на хидрофобност над 40 %, като най-силно прилепване към хексан е установено при следните щамове, изолирани от млечни ферментирали продукти (кефир и бяло саламурено сирене): *L. helveticus* WC5 (86 %), *L. brevis* K2 (72 %) и *L. plantarum* K6 съответно 52 %. Четири от щамовете с висок процент на хидрофобност, са изолирани от ферментирали зеленчуци (занаятчийско кисело зеле и кисели краставички): *L. yonginensis* S16 (50 %), *L. plantarum* S11 (46 %), *L. plantarum* S12 (44 %) и *L. koreensis* FC4 (43 %). От групата щамове изолирани от майчина кърма и фецес, само един щам- *L. plantarum* 44V, се отличава с по-висок процент на хидрофобност, а именно 51 %. Всички освен щам 44V демонстрират и висока авто-агрегационна способност към 24-ти час.

Прикрепването към въглеводороди (като хексан) се наблюдава относително рядко при млечнокиселите бактерии. Например, в проучване на Ren et al. (2014), от девет изследвани щама само два (22 %) показват сравнително висока хидрофобност (съответно 59 % и 43 %). По подобен начин Hoxha et al. (2023), съобщават, че нито един от дванадесетте изследвани от тях МКБ щама не показва хидрофобност от над 40 %.



Фигура 9. *Хидрофобност на клетъчната повърхност на изследваните МКБ.*

2.8 Анализ на молекули от клетъчна повърхност на изследваните МКБ, участващи в механизмите на агрегация.

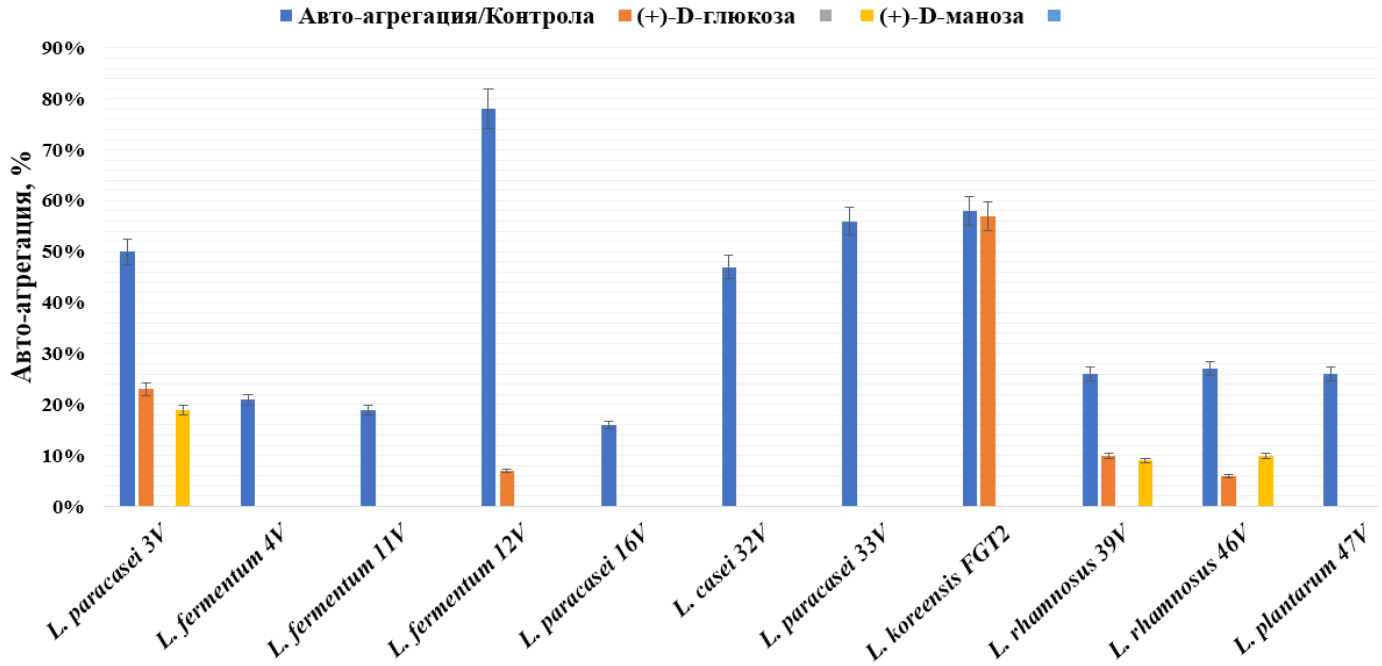
2.8.1 Тест с добавяне захари.

С цел характеризиране на молекулите, участващи в процеса на авто-агрегация, е извършена оценка на агрегационния потенциал на избрани щамове от изследваните млечнокисели бактерии, в условия на добавени различни захари. На анализ са подложени единадесет щама, като те са подбрани въз основа на техния авто-агрегационен потенциал, изследван и описан в предходните анализи - три щама *L. paracasei* (3V, 16V, 33V), три щама *L. fermentum* (4V, 11V, 12V), два щама *L. rhamnosus* (39V и 46V), както и по един щам представител на видовите *L. casei* (32V), *L. koreensis* (FGT2) и *L. plantarum* (47V). Добавянето на различни моно- и дизахариди има за цел да установи участващите повърхностни рецепторни структури по клетъчната стена на млечнокиселите бактерии.

В условия на добавена (+)-D-глюкоза е отчетено значително намаляване на авто-агрегационния капацитет при част от изследваните изолати. Например, при щамовете *L. paracasei* (3V), *L. fermentum* (12V) е установено понижение на агрегационния индекс с 20 % до 70 % след 24 часа инкубация (**Фиг. 10А**). Аналогичен инхибиторен ефект с около 50 % е наблюдаван и при представителите на *L. rhamnosus* (39V и 46V). При останалите щамовете *L. fermentum* (4V и 11V), *L. paracasei* (16V и 33V), *L. casei* 32V и *L. plantarum* 47V е отчетено пълно потискане на авто-агрегацията, което вероятно се дължи на конкурентно свързване на глюкозните молекули с повърхностните рецептори от клетъчната стена на МКБ, участващи в клетъчната адхезия. Впечатление прави щамът на *L. koreensis* (FGT2), при който не е отчетена разлика в агрегационната му способност, дори и в присъствието на захар. Получените от нас резултати са в съответствие и с други литературни източници, които също докладват за щамово специфична вариабилност в чувствителността към глюкоза. Сред изследваните от тях щамове на *L. brevis* са наблюдавани значителни различия в способността за агрегация в условия на добавена глюкоза. Щамовете NBRC 3960, 13109 и 13110

демонстрират ясно изразен агрегационен потенциал, докато NBRS 3345 показва по-слабо изразена такава. В контраст с тези резултати, щамовете NBRC 12005, 12520 и 107147T напълно липсва агрегационна реакция при същите условия, което предполага различия в експресията или наличието на повърхностни рецептори, взаимодействащи с глюкозните молекули (Saito *et al*., 2013).

Добавянето на (+)-D-маноза оказва ясно изразен инхибиторен ефект върху агрегационния потенциал при редица от изследваните изолати. Например, при *L. paracasei* 3V, е установено понижение в агрегационната способност с приблизително 30 %. Ясно изразено потискане е отчетено при *L. fermentum* 4V и 11V, двата щама на *L. paracasei* – 16V и 33V, както и при *L. casei* 32V като на практика добавянето на (+)-D-маноза оказва тотален инхибиторен ефект върху способността на щамовете да агрегират помежду си (**Фиг. 10А**). При *L. fermentum* 12 V дори ниска концентрация на манозни остатъци води до по-висока степен на инхибиране спрямо ефекта, предизвикан от глюкозата. Подобна тенденция се наблюдава и при останалите изследвани щамове. Значима редукция в агрегационната способност е отчетена при *L. plantarum* 47V и *L. koreensis* FGT2, което допълнително подкрепя хипотезата за централната роля на манозо-свързващите структури при иницииране на клетъчни взаимодействия. Тези резултати предполагат, че манозните остатъци вероятно ефективно се свързват с по-голям брой рецептори или адхезионни центрове по клетъчната повърхност на млечнокиселите бактерии.



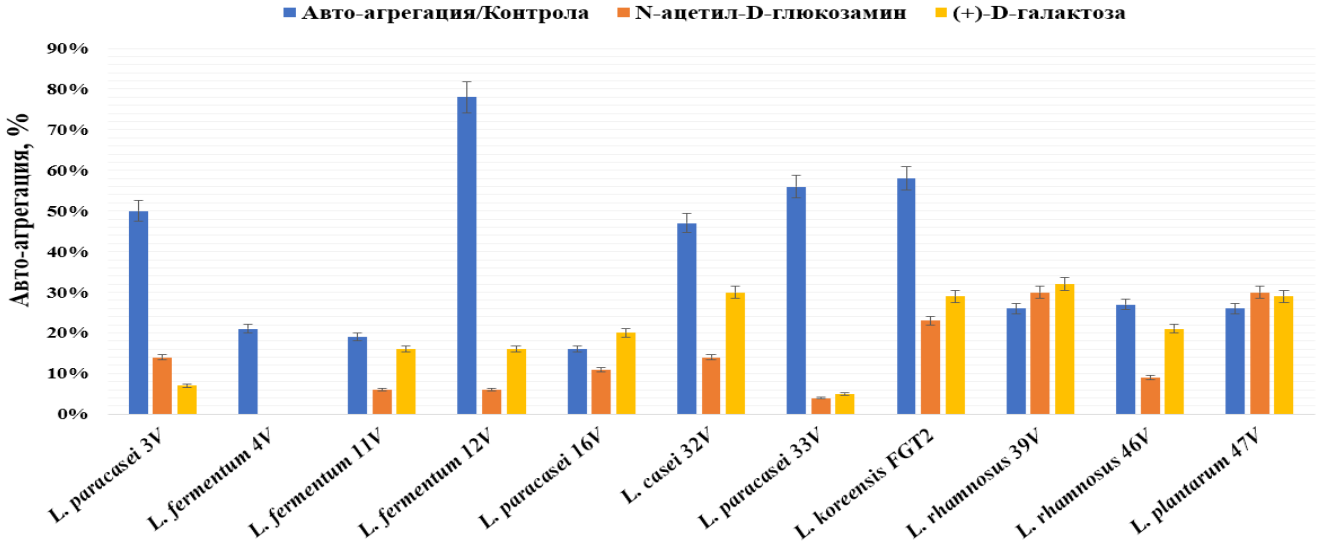
Фигура 10А. *Влияние върху авто-агрегационната способност на изследваните МКБ, в условие на добавени захари - (+)-D-глюкоза и (+)-D-маноза, на 24-ти час от провеждането на анализа.*

Резултатите от проведения експеримент със захарите N-ацетил-D-глюкозамин и (+)-D-галактоза показват, че при повечето изследвани лактобацилни щамове не се наблюдава значително въздействие върху авто-агрегационната им способност (**Фиг. 10Б**). Единствено щамът *L. fermentum* 4V демонстрира ясно изразен афинитет към двете захарни съединения, като при добавянето на N-ацетил-D-глюкозамин е регистриран необичайно понижение на автоагрегационния му потенциал. Нещо повече, наблюдава се увеличение на оптичната плътност на бактериалната култура, което предполага усвояване на този субстрат от бактерията. Слабо потискане на авто-агрегацията (между 3 % и 5 %) е наблюдавано при щамовете *L. paracasei* 33V и *L. koreensis* FGT2, още на 4-тия час след добавянето на N-ацетил-D-глюкозамин, като ефектът се усилва до края на експерименталния период (24-ти час). При изолата *L. rhamnosus* 46V добавянето на (+)-D-галактоза води до незначително намаляване на авто-агрегационната способност от около 2 % към 4-тия час, което от своя страна също подсказва за ограничено взаимодействие между галактозата и адхезионните центрове по клетъчната повърхност на изследвания щам.

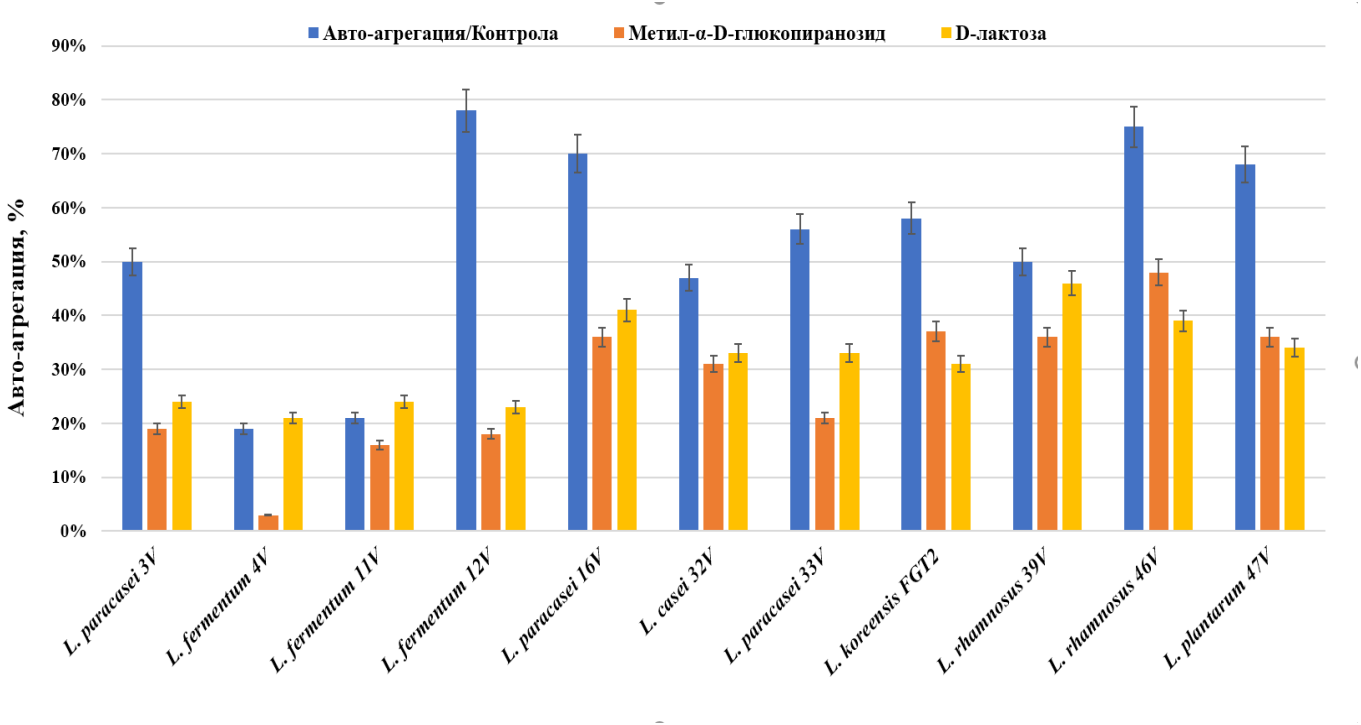
При прибавянето на метил-α-D-глюкопиранозид към бактериалните суспензии са отчетени съществени промени в авто-агрегационната способност при повечето от изследваните щамове (**Фиг. 10В**). При девет от тях (*L. paracasei* 3V, *L. fermentum* 11V и 12V, *L. paracasei* 16V, 32V и 33V, *L. koreensis* FGT2, *L. rhamnosus* 46V и *L. plantarum* 47V) е установена значима разлика спрямо контролните стойности на авто-агрегация. Впечатление правят останалите два изолата - при *L. fermentum* 4V е регистрирано пълно инхибиране на авто-агрегацията, а при *L. rhamnosus* 39V - спад от едва 13 %.

Добавянето на дизахарида D-лактоза оказва подобен ефект, като отново е регистриран отчетлив инхибиторен ефект върху авто-агрегационната способност при шест от изследваните млечнокисели изолата – 16V, 32V, 33V, FGT2, 46V и 47V (**Фиг. 10В**).

При останалите изследвани изолати наличието на лактоза не оказва съществено влияние върху авто-агрегационния им капацитет, а при някои от щамовете дори се наблюдава повишаване на оптичната плътност на бактериалните суспензии. Това вероятно се дължи на метаболизирането на захарта от бактериалните клетки, което от своя страна води до стимулиране на техния растеж и клетъчна пролиферация в разтвора.



Фигура 10Б. *Влияние върху авто-агрегационната способност на изследваните МКБ, в условие на добавени захари - N-ацетил-D-глюкозамин и (+)-D-галактоза, на 24-ти час от провеждането на анализа.*



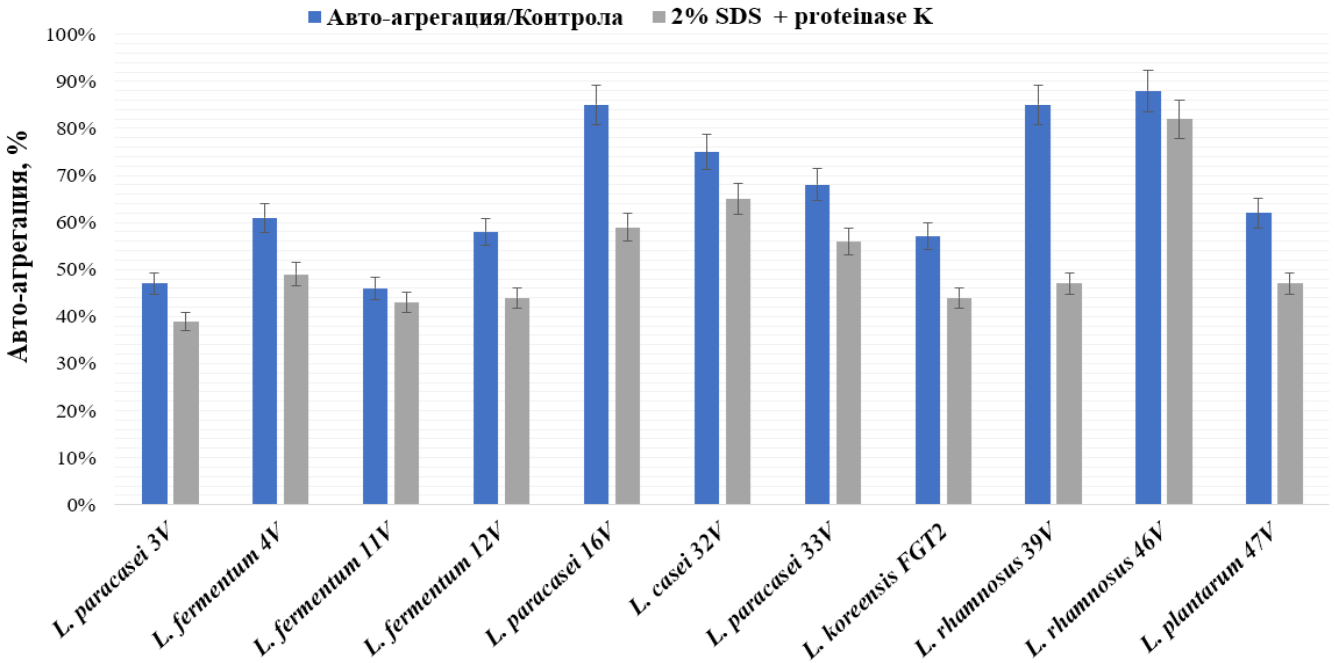
Фигура 10В. *Влияние върху авто-агрегационната способност на изследваните МКБ, в условие на добавени захари - метил-α-D-глюкопиранозид и D-лактоза , на 24-ти час от провеждането на анализа.*

2.8.2 Тест с предварителна обработка с ензими и химични реагенти.

Способността на млечнокиселите бактерии да адхезират към мукозния слой на чревната лигавица на гостоприемника представлява основен индикатор за техния пробиотичен потенциал. Тя се детерминирана от взаимодействията, които възникват между повърхностните протеини (SLP), екзополизахаридите (EPS) на клетъчната стена и факторите на външната среда. С цел да се определи участието на компонентите на извънклетъчната матрица - SLP и EPS в процесите на адхезия и хидрофобност на изследваните щамове, те са подложени на целенасочени ензимни и химични обработки, насочени към отстраняване или модификация на тези структурни елементи. На анализ са подложени същите единадесет щама, чиято агрегационна способност е изследвана и в условия на добавени инвертни захари. Целта на този анализ, е да даде допълнителна яснота относно механизмите, които имат пряко отношение към процеса на агрегация.

След обработка на бактериалните клетки с 2 % разтвор на SDS и протеиназа К е установено понижение в агрегационната способност при всички изследвани щамове (**Фиг. 11**). Най-изразен ефект е отчетен при *L. rhamnosus* 39V (38 %) и *L. paracasei* 16V (26 %). Впечатление прави факта, че именно при тези два щама в предходния анализ показват силно инхибиране на агрегацията и при добавянето на различни разтвори на захари. Подобна зависимост е описана и от Tareb et. al (2013), които установяват, че третирането на клетъчната стена на изследваните от тях щамове на *Lactobacillus* с протеиназа К и SDS води до значителна редукция на авто-агрегацията, като ефектът е съпоставим с този, наблюдаван и при техния анализ с добавяне на захари. При останалите изследвани щамове намаляването на авто-агрегационния потенциал е по-слабо изразено – между 3 % и 15 %.

Въз основа на резултатите от двата описани анализа, може да се предположи, че авто-агрегацията при изследваните млечнокисели бактерии, вероятно се медиира основно от взаимодействия между въглехидрат-лектинови и/или белтъчни компоненти.



Фигура 11. *Влияние върху авто-агрегационата способност на изследваните МКБ, след третиране на бактериалните клетки с 2 % разтвор на SDS и предварително ензимно третиране с протеиназа К.*

2.9 Изследване наличието на гени отговорни за механизмите на свързване и адхезия при МКБ.

В настоящия дисертационен труд са анализирани четиринадесет гена, свързани с клетъчната адхезия, като петдесет щама от колекцията са оценени по отношение на свързващата им способност като част от техния пробиотичен потенциал. На анализ са подложени всички щамове изолирани от майчина кърма и единичната фекална проба, както един изолат от ферментирали зеленчукови храни (ферментирали зелени домати), а именно щам *L. koreensis* FGT2.

При отчитането на резултатите е установено, че така наречените „housekeeping" гени (*ef-Tu, eno, gap, groEl* и *srtA*), участващи пряко в механизмите на адхезия, са открити при 100 % от изследваните щамове (**Табл. 9**). Според Turpin et al. (2012) същите целеви гени присъстват във всички техни млечнокисели изолати, поради което скринингът им не е от съществено значение при оценяването на адхезионния капацитет на даден щам, но може да служи като положителна контрола при откриването на други гени.

При останалите изследвани гени, участващи в адхезионните механизми (*slpA, mub1, mub2, msa, mapA, gtf, fpbA, cnb, apf, cbsA*), генът *slpA* не е установен при нито един от щамовете. По литературни данни той е характерен главно за филогенетичните групи на *L. acidophilus* и *L. brevis*, което обяснява и отсъствието му в отчетените резултати. Генът *gtf* е открит само при два щама на *L. fermentum* (12V и 23V). Честота на детекция на *mub1* е 16 %, на *msa* 16 % и на *mapA* съответно 26 %, докато генът *mub2* е установен при 72 % от изследваните щамове (**Табл. 9**). Генът *cnb*, отговорен за кодирането на колаген-свързващи протеини и *fpbA*, кодиращ фибронектин-свързващи протеини са представени при 100 % от млечнокиселите изолати. Последният, от който се приема за несъществен, е описан както при патогенни видове, така и при много млечнокисели бактерии (Christie *et al.,* 2002; Gil *et al*., 2004). Тези данни показват, че млечнокиселите бактерии и някои патогенни бактерии имат сходни механизми на свързване, включващи протеини с подобна функция. Това от своя страна, подкрепя тезата,

че някои МКБ могат да инхибират и намаляват адхезионния капацитет на патогенни бактерии към чревния епител на гостоприемника на принципа на конкурентна ко-агрегация (Michail & Abernathy, 2002). Генът *apf*, кодиращ протеина LBA043, свързан с агрегационния капацитет при бактериите, е открит при всички от изследваните щамове от колекцията. Въпреки, че в структурата на този протеин не са установени ясно изразени консервативни домени, *apf* е широко разпространен сред видовете *Lactobacillus*, което от своя страна съответства с данни от литературата (Goh & Klaenhammer, 2010).

Таблица 9. *Разпределение на гените, участващи в механизмите на свързване и адхезия в изследваната колекция от МКБ.*

ЩАМ	Гени, отговорни за механизмите на свързване										Housekeeping гени				
	slpA	*mub2*	*mub1*	*msa*	*mapA*	*gtf*	*fpbA*	*cnb*	*cbsA*	*apf*	*strA*	*groEl*	*gap*	*eno*	*Ef-Tu*
L. paracasei **1V**	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
L. paracasei **2V**	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
L. paracasei **3V**	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
L. fermentum **4V**	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
L. fermentum **5V**	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
L. fermentum **6V**	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
L. casei **7V**	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
L. casei **8V**	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
L. casei **9V**	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
L. paracasei **10V**	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
L. fermentum **11V**	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
L. fermentum **12V**	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
L. paracasei **13V**	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
L. fermentum **14V**	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
L. casei **15V**	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
L. paracasei **16V**	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
L. fermentum **17V**	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
L. fermentum **18V**	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L. paracasei **19V**	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
L. casei **20V**	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L. fermentum **21V**	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
L. paracasei **22V**	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
L. fermentum **23V**	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
L. casei **24V**	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
L. fermentum **25V**	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
L. paracasei **26V**	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
L. paracasei **27V**	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L. casei **28V**	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
L. paracasei **29V**	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
L. paracasei **30V**	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
L. casei **31V**	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+

ЩАМ	Гени, отговорни за механизмите на свързване										Housekeeping гени				
	slpA	*mub2*	*mub1*	*msa*	*mapA*	*gtf*	*fpbA*	*cnb*	*cbsA*	*apf*	*strA*	*groEl*	*gap*	*eno*	*Ef-Tu*
L. casei **32V**	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
L. paracasei **33V**	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
L. rhamnosus **34V**	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
L. koreensis **FGT2**	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L. plantarum **36V**	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
L. rhamnosus **37V**	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L. rhamnosus **38V**	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L. rhamnosus **39V**	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L. rhamnosus **40V**	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
L. paracasei **41V**	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L. bulgaricus **42V**	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
L. plantarum **43V**	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
L. plantarum **44V**	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
L. rhamnosus **45V**	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
L. plantarum **46V**	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
L. rhamnosus **47V**	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
L. plantarum **48V**	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L. rhamnosus **49V**	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
L. rhamnosus **50V**	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+

Легенда: *„+“ – наличие на амплификация на гена; „-„ – отсъствие на амлификация на гена;*

III. Безопасност на създадената колекция МКБ, като основно изискване за потенциалното им включване в пробиотичен продукт

3.1 Изследване на антибиотичната резистентност.

3.1.1 Фенотипна антибиотична резистентност.

В настоящия дисертационен труд е изследвана антибиотичната чувствителност на всички млечнокисели изолати към десет антибиотика (ампицилин, тетрациклин, еритромицин, гентамицин, стрептомицин, ванкомицин, неомицин, цефалотин, ципрофлоксацин и хлорамфеникол) посредством прилагането на диск-дифузионния метод. Резултатите са обобщени в **Табл. 10** и **Табл. 11**, където изолатите са категоризирани според класификацията на Yasmin et al. (2019). На база отчетените резултати е установена вариабилност в чувствителността към различните антибиотици дори на вътревидово ниво.

В групата на млечнокиселите щамове, изолирани от ферментирали зеленчукови и млечни продукти, е отчетена пълна резистентност към ванкомицин и стрептомицин (**Табл. 10**). Изключение прави щамът на *L. plantarum* S13, който демонстрира силна чувствителност към стрептомицина. Получените резултати се различават от публикуваните данни на Ren и колектив (2014), които установяват, че всички изследвани МКБ, изолирани от ферментирали храни, са чувствителни към стрептомицин. Значителна част от щамовете показват резистентност или умерена чувствителност към цефалотин (71 %), неомицин (58 %) и ципрофлоксацин (80 %). При три щама - I2 (*L. plantarim*), I3 (*L. brevis*) и I4 (*L. helveticus*) е отчетена резистентност към хлорамфеникол, докато останалите щамове демонстрират силна чувствителност. Почти половината изолати (47 %), получени от различни ферментирали продукти, проявяват резистентност или умерена чувствителност към гентамицин. От друга страна, повечето щамове са силно чувствителни към ампицилин, тетрациклин и еритромицин, с изключение на *L. yonginensis* S16, който показва резистентност към тетрациклин

Table 10. *Antibiotic susceptibility testing of LAB isolated from vegetable and dairy fermented products.*

Таблица 10. *Изследване на антибиотичната чувствителност на МКБ, изолирани от зеленчукови и млечни ферментирали продукти.*

ЩАМ	*Тест антибиотици (зона на инхибиране, mm)*									
	Amp. (A/S) (10µg/disk)	Tetr. (T) (10µg/disk)	Vanc. (VA) (5 µg /disk)	Cip. (CP) (10µg/disk)	Ceph. (CF) (10µg/disk)	Chlor. (C) (30µg/disk)	Gent. (G) (10µg/disk)	Eryth. (E) (15µg/disk)	Strept. (S) (10µg/disk)	Neom. (N) (5 µg/disk)
L. plantarum S1	35/SS	21/SS	0/R	0/R	0/R	32/SS	10/MS	26/SS	0/R	11/SS
L. brevis S2	30/SS	16/SS	0/R	0/R	0/R	31/SS	13/SS	25/SS	0/R	15/SS
L. plantarum S3	31/SS	21/SS	0/R	0/R	0/R	33/SS	10/MS	26/SS	0/R	12/SS
L. plantarum S4	34/SS	21/SS	0/R	0/R	0/R	34/SS	11/SS	25/SS	0/R	11/SS
L. plantarum S5	24/SS	22/SS	0/R	0/R	0/R	32/SS	10/MS	26/SS	0/R	8/MS
L. plantarum S6	40/SS	22/SS	0/R	0/R	17/SS	35/SS	13/SS	27/SS	0/R	15/SS
L. plantarum S7	30/SS	22/SS	0/R	0/R	17/SS	33/SS	12/SS	27/SS	0/R	13/SS
L. plantarum S7'	36/SS	21/SS	0/R	0/R	13/SS	32/SS	15/SS	29/SS	0/R	9/MS
L. plantarum S8	27/SS	25/SS	0/R	0/R	14/SS	36/SS	9/MS	27/SS	0/R	0/R
L. plantarum S9	40/SS	25/SS	0/R	0/R	16/SS	35/SS	11/SS	27/SS	0/R	9/MS
L. plantarum S10	40/SS	24/SS	0/R	0/R	0/R	35/SS	14/SS	29/SS	0/R	0/R
L. plantarum S11	35/SS	23/SS	0/R	0/R	19/SS	34/SS	10/MS	30/SS	0/R	15/SS
L. plantarum S12	32/SS	25/SS	0/R	0/R	10/MS	36/SS	10/MS	30/SS	0/R	10/MS
L. plantarum S13	35/SS	20/SS	0/R	0/R	0/R	33/SS	18/SS	27/SS	17/SS	15/SS
L. plantarum S14	35/SS	25/SS	0/R	0/R	0/R	35/SS	8/MS	27/SS	0/R	20/SS
L. brevis S15	26/SS	15/SS	0/R	0/R	0/R	31/SS	12/SS	29/SS	0/R	0/R
L. yonginensis S16	30/SS	0/R	0/R	15/SS	0/R	32/SS	15/SS	35/SS	0/R	18/SS
L. koreensis FGT1	30/SS	16/SS	0/R	0/R	0/R	30/SS	0/R	26/SS	0/R	0/R
L. koreensis FGT2	37/SS	15/SS	0/R	0/R	0/R	30/SS	0/R	25/SS	0/R	0/R
L. koreensis FGT3	26/SS	15/SS	0/R	0/R	0/R	32/SS	0/R	30/SS	0/R	0/R
L. koreensis FGT4	25/SS	18/SS	0/R	0/R	0/R	30/SS	0/R	26/SS	0/R	0/R
L. plantarum FC1	25/SS	18/SS	0/R	0/R	0/R	30/SS	0/R	25/SS	0/R	10/MS
L. koreensis FC2	31/SS	21/SS	0/R	0/R	0/R	36/SS	0/R	30/SS	0/R	10/MS
L. koreensis FC3	30/SS	16/SS	0/R	0/R	0/R	36/SS	0/R	30/SS	0/R	0/R

L. koreensis FC4	25/SS	17/SS	0/R	0/R	0/R	33/SS	0/R	25/SS	0/R	0/R
L.brevis K1	29/SS	20/SS	0/R	10/MS	0/R	32/SS	22/SS	30/SS	0/R	13/SS
L. brevis K2	39/SS	30/SS	0/R	12/SS	0/R	39/SS	9/MS	31/SS	0/R	13/SS
L. plantarum K3	26/SS	15/SS	0/R	0/R	0/R	27/SS	10/MS	29/SS	0/R	12/SS
L. brevis K4	25/SS	12/SS	0/R	0/R	0/R	25/SS	10/MS	15/SS	0/R	11/SS
L. brevis K5	23/SS	15/SS	0/R	0/R	0/R	27/SS	11/MS	25/SS	0/R	11/SS
L. plantarum K6	28/SS	18/SS	0/R	0/R	0/R	26/SS	0/R	24/SS	0/R	8/MS
L. brevis K7	27/SS	20/SS	0/R	10/MS	0/R	30/SS	15/SS	30/SS	0/R	16/SS
L. brevis K8	25/SS	23/SS	0/R	0/R	0/R	33/SS	20/SS	30/SS	0/R	25/SS
L. helveticus WC1	37/SS	20/SS	0/R	11/SS	9/MS	31/SS	13/SS	28/SS	0/R	0/R
L. helveticus WC2	28/SS	18/SS	0/R	10/MS	13/SS	34/SS	13/SS	25/SS	0/R	0/R
L. helveticus WC3	45/SS	19/SS	0/R	0/R	0/R	35/SS	20/SS	30/SS	0/R	14/SS
L. helveticus WC4	36/SS	27/SS	0/R	10/MS	0/R	35/SS	10/MS	29/SS	0/R	13/SS
L. helveticus WC5	40/SS	30/SS	0/R	12/SS	17/SS	37/SS	14/SS	31/SS	0/R	0/R
L. plantarum WC6	33/SS	25/SS	0/R	13/SS	15/SS	34/SS	18/SS	29/SS	0/R	0/R
L. plantarum I1	35/SS	27/SS	0/R	0/R	15/SS	36/SS	14/SS	30/SS	0/R	0/R
L. plantarum I2	35/SS	20/SS	0/R	38/SS	0/R	0/R	19/SS	30/SS	0/R	0/R
L. brevis I3	35/SS	26/SS	0/R	37/SS	15/SS	0/R	14/SS	29/SS	0/R	0/R
L. helveticus I4	30/SS	26/SS	0/R	35/SS	0/R	0/R	19/SS	30/SS	0/R	9/MS
L. plantarum I5	31/SS	26/SS	0/R	11/SS	12/SS	34/SS	14/SS	28/SS	0/R	0/R
L. brevis I6	40/SS	25/SS	0/R	8/MS	17/SS	36/SS	11/SS	31/SS	0/R	0/R

Легенда: *d < 8 mm - щама е резистентен към дадения антибиотик (R);*

d между 8 и 10 mm - умерено чувствителен (MS);

d > 10 mm - щама се явява силно чувствителен към антибиотика (SS).

.

В групата на щамовете изолирани от майчина кърма и фецес е установена пълна резистентност към ванкомицин (**Табл. 11**). Тази проява на резистентност към ванкомицин, от страна на всички изследвани щамове е потвърдена в литературата. Повечето представители на рода *Lactobacillus* демонстрират устойчивост към гликопептидни антибиотици, включително ванкомицин, като изключение правят единствено задължителните хетероферментативни видове. Въпреки това, установената резистентност към ванкомицин при *Lactobacillus* е доказана като вътрешноприсъща (Tynkkynen *et al*., 1998), и не би трябвало да се сравнява с преносимата, плазмидно-медиирана резистентност, характерна за ентерококите (Leclercq *et al*., 1992). Всички щамове показват силна чувствителност към тетрациклин и хлорамфеникол. Изключение прави само един щам - *L. fermentum* 5V, който се оказва резистентен и към двата антибиотика. При 11 % от щамовете е установена умерена чувствителност към цефалотин, останалите щамове се проявяват като резестентни към действието на антибиотика. От друга страна, по-голямата част от щамовете са силно чувствителни към действието на ципрофлаксацин (92 %), гентамицин (96 %), стрептомицин (88 %) и еритромицин. Отново само щам *L. fermentum* 5V се отличава като единствено той се явява резистентен към еритромицина. Обикновено видовете *Lactobacillus* демонстрират висока чувствителност към антибиотици, които инхибират белтъчния синтез, като еритромицин, хлорамфеникол и клиндамицин (Coppola *et al*., 2005; Klare *et al*., 2007).

По-нисък е процента на чувствителните щамове към действието на ампицилина - 67 %, при останалите изолати е наблюдавана резистентност или умерена чувствителност. Резистентност към аминогликозиди, като неомицин, канамицин, стрептомицин и гентамицин, е също често наблюдавана при лактобацилите (Danielsen & Wind, 2003; Coppola *et al*., 2005; Zhou *et al*., 2005). Също така е доказано, че използваната хранителна среда оказва значимо влияние върху класифицирането на МКБ като чувствителни или резистентни, особено в случаите с аминогликозиди и при използване на MRS среда (Huys *et al*., 2002).

В изследваната група щамове е детектирана силна чувствителност към неомицин при само 24 % от изолатите. При останалите е отчетена резистентност или умерена чувствителност.

Table 11. *Antibiotic susceptibility testing of LAB isolated from breast milk and feces.*

Таблица 11. *Изследване на антибиотичната чувствителност на МКБ, изолирани от майчина кърма и фецес.*

ЩАМ	*Тест антибиотици (зона на инхибиране, mm)*									
	Amp. (A/S) (10µg/disk)	Tetr. (T) (10µg/disk)	Vanc. (VA) (5µg /disk)	Cip. (CP) (10µg/disk)	Ceph. (CF) (10µg/disk)	Chlor. (C) (30µg/disk)	Gent. (G) (10µg/disk)	Eryth. (E) (15µg/disk)	Strept. (S) (10µg/disk)	Neom. (N) (5µg/disk)
L. paracasei 1V	37/SS	43/SS	0/R	17/SS	0/R	34/SS	18/SS	38/SS	24/SS	0/R
L. paracasei 2V	14/SS	38/SS	0/R	17/SS	0/R	36/SS	24/SS	37/SS	28/SS	15/SS
L. paracasei 3V	37/SS	20/SS	0/R	11/R	0/R	25/SS	20/SS	27/SS	21/SS	13/SS
L. fermentum 4V	19/SS	30/SS	0/R	25/SS	10/MS	30/SS	25/SS	35/SS	24/SS	10/MS
L. fermentum 5V	16/SS	0/R	0/R	15/SS	16/SS	0/R	0/R	0/R	0/R	13/SS
L. fermentum 6V	36/SS	22/SS	0/R	20/SS	0/R	35/SS	20/SS	33/SS	0/R	11/SS
L. casei 7V	0/R	40/SS	0/R	30/SS	0/R	34/SS	28/SS	40/SS	27/SS	13/SS
L. casei 8V	0/R	40/SS	0/R	25/SS	0/R	32/SS	29/SS	38/SS	33/SS	3/R
L. casei 9V	0/R	38/SS	0/R	27/SS	0/R	30/SS	20/SS	35/SS	28/SS	8/R
L. paracasei 10V	12/MS	39/SS	0/R	18/SS	0/R	36/SS	23/SS	36/SS	25/SS	13/SS
L. fermentum 11V	19/SS	35/SS	0/R	20/SS	3/R	30/SS	26/SS	38/SS	34/SS	10/MS
L. fermentum 12V	15/SS	33/SS	0/R	23/SS	10/MS	35/SS	28/SS	40/SS	37/SS	8/R
L. paracasei 13V	40/SS	41/SS	0/R	22/SS	0/R	33/SS	21/SS	40/SS	28/SS	10/MS
L. fermentum 14V	20/SS	33/SS	0/R	25/SS	0/R	30/SS	28/SS	39/SS	29/SS	0/R
L. casei 15V	0/R	36/SS	0/R	25/SS	0/R	35/SS	25/SS	35/SS	25/SS	10/MS
L. paracasei 16V	39/SS	44/SS	0/R	21/SS	13/SS	39/SS	25/SS	42/SS	30/SS	11/SS
L. fermentum 17V	0/R	40/SS	0/R	25/SS	0/R	36/SS	20/SS	40/SS	27/SS	4/R
L. fermentum 18V	20/SS	36/SS	0/R	28/SS	0/R	33/SS	23/SS	39/SS	24/SS	3/R
L. paracasei 19V	0/R	35/SS	0/R	25/SS	0/R	25/SS	23/SS	38/SS	30/SS	10/MS
L. casei 20V	0/R	30/SS	0/R	20/MS	0/R	25/SS	20/SS	35/SS	20/SS	10/MS
L. fermentum 21V	36/SS	33/SS	0/R	16/MS	0/R	33/SS	0/R	32/SS	12/SS	0/R
L. paracasei 22V	34/SS	38/SS	0/R	19/MS	0/R	35/SS	21/SS	39/SS	28/SS	13/SS
L. fermentum 23V	9/MS	30/SS	0/R	25/SS	10/MS	30/SS	25/SS	35/SS	24/SS	10/MS
L. casei 24V	0/R	35/SS	0/R	25/SS	0/R	32/SS	17/SS	30/SS	20/MS	0/R
L. fermentum 25V	15/SS	25/SS	0/R	15/SS	0/R	25/SS	25/SS	35/SS	25/SS	18/SS
L. paracasei 26V	0/R	40/SS	0/R	28/SS	0/R	35/SS	28/SS	39/SS	20/SS	0/R
L. paracasei 27V	41/SS	42/SS	0/R	22/SS	0/R	39/SS	21/SS	42/SS	29/SS	10/MS
L. casei 28V	0/R	40/SS	0/R	30/SS	0/R	30/SS	30/SS	36/SS	25/SS	10/MS
L. paracasei 29V	0/R	39/SS	0/R	29/SS	0/R	28/SS	20/SS	38/SS	25/SS	0/R
L. paracasei 30V	0/R	37/SS	0/R	29/SS	0/R	30/MS	20/SS	39/SS	20/SS	10/MS

L. casei 31V	0/R	35/SS	0/R	30/SS	0/R	30/SS	18/SS	35/SS	23/SS	0/R
L. casei 32V	0/R	33/SS	0/R	28/SS	0/R	30/SS	20/SS	35/SS	20/SS	10/MS
L. paracasei 33V	34/SS	21/SS	0/R	12/SS	0/R	26/SS	18/SS	31/SS	23/SS	24/SS
L. paracasei 34V	40/SS	40/SS	0/R	24/SS	0/R	39/SS	21/SS	36/SS	28/SS	12/SS
L. rhamnosus 36V	30/SS	35/SS	0/R	20/SS	0/R	31/SS	10/MS	29/SS	9/MS	10/MS
L. rhamnosus 37V	28/SS	35/SS	0/R	15/SS	0/R	28/SS	9/MS	28/SS	13/SS	0/R
L. rhamnosus 38V	30/SS	35/SS	0/R	27/SS	0/R	30/SS	10/MS	29/SS	15/SS	0/R
L. rhamnosus 39V	30/SS	35/SS	0/R	10/MS	0/R	28/SS	9/MS	28/SS	10/MS	0/R
L. rhamnosus 40V	32/SS	33/SS	0/R	0/R	0/R	31/SS	16/SS	27/SS	9/MS	0/R
L. delbrueckii 41V	30/SS	35/SS	0/R	30/SS	0/R	30/SS	10/MS	29/SS	9/MS	10/MS
L. rhamnosus 42V	30/SS	37/SS	0/R	28/SS	0/R	30/SS	9/MS	29/SS	14/SS	10/MS
L. paracasei 43V	35/SS	32/SS	0/R	30/SS	0/R	35/SS	9/MS	30/SS	0/R	0/R
L. plantarum 44V	33/SS	32/SS	0/R	23/SS	0/R	34/SS	11/SS	29/SS	8/MS	10/MS
L. rhamnosus 45V	28/SS	34/SS	0/R	29/SS	0/R	28/SS	10/MS	27/SS	9/MS	10/MS
L. rhamnosus 46V	28/SS	33/SS	0/R	30/SS	0/R	28/SS	9/MS	26/SS	9/MS	10/MS
L. plantarum 47V	28/SS	28/SS	0/R	0/R	0/R	28/SS	9/MS	24/SS	0/R	0/R
L. plantarum 48V	30/SS	27/SS	0/R	0/R	0/R	28/SS	11/SS	34/SS	0/R	0/R
L. rhamnosus 49V	20/SS	37/SS	0/R	30/SS	0/R	28/SS	9/MS	27/SS	9/MS	0/R
L. plantarum 50V	28/SS	27/SS	0/R	20/SS	0/R	29/SS	11/SS	25/SS	0/R	15/SS

Легенда: *d < 8 mm - щама е резистентен към дадения антибиотик (R);*

d между 8 и 10 mm - умерено чувствителен (MS);

d > 10 mm - щама се явява силно чувствителен към антибиотика (SS).

3.1.2 Генотипна антибиотична резистентност – PCR анализ на гени за антибиотичната резистентност.

Фенотипните анализи за антибиотична резистентност в това изследване, демонстрират, че всички изследвани млечнокисели изолати, принадлежащи към семейство *Lactobacillaceae*, проявяват резистентност към един или почеве антибиотици. За да се уточни естеството на тази резистентност, като допълнителен анализ е проведена PCR амплификация със специфични праймери за гени на придобита резистентност: гентамицин (*acc60-aph2*), хлорамфеникол (*catplp501*), тетрациклин (t*etM*), β-лактамаза (*blaZ*), макролиди (*mefA*), канамицин (*aphA3*), еритромицин (*erm, ermB*), флуорохинони (*gyrA*) и ванкомиин (*vanA*). При нито един от щамовете не са установени амплификационни продукти, което потвърждава, че изолатите не носят тези гени.

На база получените резултати може да допуснем, че всички млечнокисели бактерии както изолираните от ферментирали зеленчукови и млечни продукти, така и тези от кърма и фекални проби, проявяват вътрешноприсъща резистентност, която вероятно се дължи на различни механизми за неутрализиране активността на определени антибиотици, и не представляват потенциални носители на гени за антибиотична резистентност.

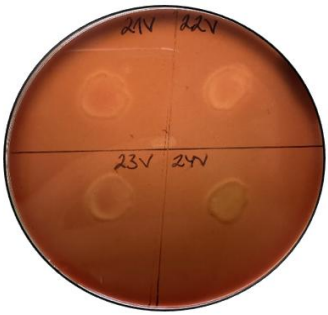
3.2 PCR анализ на гени, свързани с образуване на биогенни амини.

В настоящото изследване като част от анализите оценяващи безопасността на изследваната колекция от млечнокисели бактерии е проведен PCR анализ, който оценява потенциалната способност на щамовете да синтезират биогенни амини. Анализът е проведен посредством специфични двойки праймери за ключови гени, свързани с образуването на БА. За целите на анализа са използвани три двойки праймери, като първите две (*hdc1* и *hdc2*) са специфични за различни сегменти на гена, отговорен за синтеза на ензима хистидин декарбоксилаза, а третата (*tdc*) за гена, кодиращ тирозин декарбоксилаза.

При отчитането на резултатите от анализа е установено, че при нито един от всички изследвани млечнокисели изолати, няма амплификационни продукти, което от своя страна показва, че те не носят съответните гени. Това е още един критерии, които затвърждава безопасността на изследвана група млечнокисели бактерии.

3.3 Изследване на хемолитичната активност.

В рамките на настоящия дисертационен труд, хемолитичната активност на цялата колекция от млечнокисели изолати е анализирана върху кръвен агар (**Фиг. 12** и **Фиг. 13**). Резултатите показват липса на хемолитичен ефект при всички щамове, което се потвърждава от отсъствието на хидролизни зони около прорастналите колонии. Наблюденията от настоящото изследване са в съответствие с публикувани данни от Wang et. al. (2018), които при оценка на пробиотичния потенциал на млечнокисели бактерии, изолирани от немлечни китайски ферментирали продукти, също не установяват хемолитична активност. Това допълнително потвърждава хипотезата, че липсата на хемолитични свойства е широко разпространена характеристика сред различни изолати млечнокисели бактерии, независимо от техния произход, и представлява важен критерий за безопасност при подбора на щамове с потенциално приложение като пробиотици.



Фигура 12. *Изследване на хемолитичната активност на щамове 21V, 22V, 23V и 24V.*

Фигура 13. *Изследване на хемолитичната активност – референтен щам Bacillus cereus NBIMCC 1085 за β-хемолиза.*

ИЗВОДИ

1. Характеризирана е колекция от млечнокисели бактерии с различен екологичен произход (ферментирали храни, кърма и фецес), която включва представители на различни видове и родове от семейство *Lactobacillaceae* .След настъпване на значима таксономична реклацификация представителите на род *Lactobacillus* в колекцията са слабо представени.
2. Анализът на таксономичната структура на изследваната колекция показва, че при изолатите от ферментирали храни доминират родовете *Lactiplantibacillus*, *Levilactibacillus* и *Lactobacillus*, докато при пробите с човешки произход – *Lacticaseibacillus* и *Limosilactobacillus*.
3. Най-често представени в различните екологични биотопи са видовете *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. fermentum* и *L. brevis*, което показва адаптивност на млечнокиселите бактерии към различни екосистеми.
4. Всички изследвани изолати проявяват антиоксидантна активност, като някои от тях имат изразена висока редуцираща способност.
5. Значима част от изолатите са силни продуценти на водороден пероксид и образуват биофилми, което свидетелства за изразен метаболитен и защитен потенциал.
6. Антагонистична активност, присъща на 54% от тестваните млечнокисели бактерии се изразява в инхибиране на растежа на патогенни тест-микроорганизми и продукция на анти-биофилм вещества. Тези резултати разкриват нови възможности за приложение на тези изолати в контрол на патогенна микрофлора.
7. Установена е висока авто-агрегационна способност при 57% от изолатите, както щамово и видово специфична ко-агрегация с тест патогенни микроорганизми.

8. Адхезията към муцин и клетъчната хидрофобност се проявяват в строго щам-зависим модел, повлиян от наличието на въглехидратни компоненти и „housekeeping" гени.

9. Агрегационните свойства се обуславят от наличието на въглехидратни и белтъчни рецептори, което потвърждава ролята на клетъчната повърхност в механизма на клетъчна адхезия.

10. Молекулните изследвания идентифицират наличието на ключови гени, свързани с адхезивни механизми (като *mub*, *mapA*, *ef-Tu*, *groEl*, *slpA* и др.) в генома на изследваните щамове. Това предоставя молекулярно обяснение за наблюдаваните функционални свойства и подчертава важността на тези фактори за пробиотичния ефект.

11. Комплексната оценка на безопасността на колекцията доказа, че изследваните щамове са подходящи кандидати за пробиотици. Няма изолати с хемолитична активност или наличие на гени, свързани с биосинтезата на биогенни амини (хистидин- и тирозин-декарбоксилаза).

12. Фенотипните и генотипните изследвания на антибиотичната резистентност потвърждават безопасността на тестваните МКБ. Всички щамове са чувствителни към широкоспектърни антибиотици (тетрациклин, ципрофлоксацин, хлорамфеникол, гентамицин, еритромицин и стрептомицин), като проявяват единствено своята вродена естествена резистентност към ванкомицин. Не са открити гени за придобита антибиотична резистентност.

ПРИНОСИ

I. Приноси с фундаментален характер

1. За първи път е проведено комплексно микробиологично проучване на потенциално пробиотични лактобацили, което обхваща три различни биотопа – традиционни български ферментирали храни от растителен и млечен произход, проби от майчина кърма на български донорки и фекални проби от техните новородени.
2. Настоящото изследване обогатява съществуващите знания за видовото разнообразие на млечнокисели бактерии, изолирани от традиционни български ферментирали храни, като за пръв път са идентифицирани и докладвани видове *L. koreensis* и *L. yonginensis.*
3. Разширени са знанията за видовото разнообразие на млечнокисели бактерии в кърма от български донорки.

II. Приноси с приложен характер

1. Проведеното комплексно фенотипно и генотично изследване разкрива нови щамове с изцяло български произход от различни биотопи, с обещаващ пробиотичен потенциал, притежаващи антиоксидантна, авто-агрегационна и адхезионна активност, безопасен профил и възможност за приложение във функционални храни и пробиотични формули.

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

Публикации във връзка с дисертацията

1. **Viktoria Marinova - Yordanova**, Yoana Kizheva, Iliyana Rasheva, Hristova, Petya, **Traditional Bulgarian Fermented Foods as a Source of Beneficial Lactic Acid Bacteria**, Frontiers of Bioscience - Elite, vol:16 (1), issue:7, **2024**, ISSN (print):1945-0494, ISSN (online):1945-0508, doi:https://doi.org/10.31083/j.fbe1601007, Ref, IR, SCOPUS, SJR (0.412 - 2024), SCOPUS Quartile: Q2 (2024), PhD
2. Asenova A., Hristova H., Ivanova S., Miteva V., Zhivkova I., Moncheva P., Nedeva T., **Marinova-Yordanova V**., Hristova P., Rasheva I., **Identification and Characterization of Human Breast Milk and Infant Fecal Cultivable Lactobacilli Isolated in Bulgaria A Pilot Study**, Microorganisms, vol:12, issue:9, **2024**, doi:https://doi.org/10.3390/microorganisms12091839, Ref, Web of Science, IF (4.1 - 2023), Web of Science Quartile: Q2 (2024), SCOPUS, SJR (0.94 - 2023), SCOPUS Quartile: Q2 (2024), PhD, MSc
3. **Viktoria Marinova - Yordanova**, Yoana Kizheva, Iliyana Rasheva, Hristova, Petya, **Evaluation of Adhesive and Aggregation Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Different Biotopes**, Journal of Chemical Technology and Metallurgy, vol:volume 60, issue:issue 6, **2025**, ISSN (print):1314-7471 , ISSN (online):1314-7978 , doi:https://doi.org/10.59957/jctm.v60.i6.2025.8 , Ref, IR , SCOPUS, SJR (0.19 - 2023), SCOPUS Quartile: Q3 (2024)

Участия в проекти във връзка с дисертацията

1. **Виктория Маринова-Йорданова**, Микробиом и състав на кърма – ключови фактори, роля и взаимовръзка с оралната и чревна микробиота при новородени деца, Член, , Номер на договора:КП-06-Н61/9

2. **Виктория Маринова-Йорданова**, Изследване на пробиотичните свойства и биологичния потенциал на млечнокисели бактерии, изолирани от ферментирали храни с различен произход, Член, Номер на договора:80-10-30/20/04/2023
3. **Виктория Маринова-Йорданова**, Микробиологични и молекулярно-генетични проучвания на придобития имунитет при ентерококите и връзката му с трансфера на гени за антибиотична резистентност. Потенциал за генен обмен между видовете, Член, 2024
4. **Виктория Маринова-Йорданова**, Изследване на адхезионните свойства на млечнокисели бактерии,изолирани от кърма и фецес на новородени, Член, , Номер на договора:80-10-120/16.04.2024

Участия на национални и международни конгреси, симпозиуми и конференции с научни съобщения във връзка с дисертацията

Национални:

1. **Viktoria Marinova-Yordanova**, Iliyana Rasheva, Yoana Kizheva , Petia Hristova, „Diversity of *Lactiplantibacillus plantarum* Isolated from Traditional Bulgarian Fermented Foods ". младежката научна конференция „60 години катедра Обща и промишлена микробиология" , (17 ноември, София), България, **2023**г., участие с постер.
2. **В. Маринова-Йорданова**, И. Ращева, Й. Кижева, М. Пандова, Й. Гладичева, Ц. Димова, П. Христова, „Изследване на пробиотичните свойства и биологичния потенциал на млечнокисели бактерии, изолирани от ферментирали храни с различен произход"**.** „Европейска нощ на учените", (29 септември, София), България, **2023**г., участие с постер.
3. Winter School on Open and Responsible Research and Innovation 2025, Банкя (София), (4-7 Февруари) **2025**, участие в Международно зимно докторантско училище за отворена наука.

4. **Viktoria Marinova-Yordanova**, Teodora Gandova, „Mother's Milk Is Love. How Open Science Can Solve Scientific And Research Problems“, Първа национална конференция с международно участие за отворената наука в България, София (България), (1 Юли) **2025**г., участие с постер и представяне на проект;

Международни:

1. **Viktoria Marinova-Yordanova**, Iliyana Rasheva, Yoana Kizheva, Petia Hristova, „Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Bulgarian Fermented Foods “. - международен научен форум „Климентови дни“, (9-11 ноември, София), България, **2023**г., участие с постер.
2. **V. Marinova-Yordanova**, I. Rasheva, D. Todorov, A. Hinkov P. Hristova, „Biological Activities of Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Fermented Foods’. - международен научен форум „European Biotechnology Congress”, (2-6 октомври, Любляна),Словения, **2023**г., участие с постер.
3. **Viktoria Marinova-Yordanova** ,Iliyana Rasheva, Yoana Kizheva , Petia Hristova, „ Investigation of the Adhesive Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Breast Milk and Feces of Newborns”. „The 18th Congress of the International Union of Microbiological Societies (IUMS)”, Флоренция (Италия), (23-25 Октомври) **2024**г. , участие с постер.

Награди

1. Първа награда на Министерството на образованието и науката за млад изследовател за прилагане на принципите на отворената наука, „Орбит“ 2025, реализиране на проект „Mother's Milk Is Love. How Open Science Can Solve Scientific And Research Problems“.