



БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА „БИОТЕХНОЛОГИЯ“

Никола Николов Атанасов

**Свойства и характеристики на новоизолирани щамове
млечнокисели бактерии и приложение в моделни пробиотични
продукти за орално здраве**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“
В ПРОФЕСИОНАЛНО НАПРАВЛЕНИЕ
5.11. Биотехнологии
ДП ТЕХНОЛОГИЯ НА БИОЛОГИЧНО АКТИВНИТЕ ВЕЩЕСТВА

Научен ръководител: доц. д-р Диляна Николова

София
2024 година



Благодаря на научния ми ръководител доц. д-р Диляна Николова за съвместната работа, насоките, препоръките и споделения професионален опит при изработването на дисертационния ми труд, както и за създаването на положителна работна обстановка.

Благодаря на доц. д-р Яна Евстатиева и колегите от катедра Биотехнология за сътрудничество и подкрепата по време на работния процес, за споделения опит и за поддържане на положителни колегиални отношения.

Благодаря на гл. ас. д-р Славил Пейков за професионалната консултация при провеждане на генетичните и биоинформатичните анализи.

Благодаря на моите колеги, дипломанти от ОКС Бакалавър и Магистър на специалност Биотехнологии, Петя Пенкова, Мартина Михайлова-Върбева и Денис Борисов, с които работихме в сътрудничество и взаимно подпомагахме изследователското си израстване.

Благодаря на семейството ми за моралната подкрепа.



Дисертационният труд съдържа общо 149 страници във формат А4, 18 таблици и 26 фигури от които 15 таблици и 21 фигури са в Резултати и Обсъждане. В литературната справка са включени 467 литературни източника, от които 1 е на Български език и 466 са на Английски език.

Изследвателската работа по дисертационния труд е финансирана чрез:

1. Проект Целево изолиране и охарактеризиране на щамове млечнокисели бактерии от резидентната микробиота в устната кухина на човек или от специфични хранителни продукти и определяне на основни пробиотични свойства, договор № 80-10-69/ 25.03.2021 г.
2. Проект Оценка на пробиотични и технологични характеристики на новоизолирани щамове орални млечнокисели бактерии, договор № 80-10-78/11.05.2022 г.
3. Национална научна програма „Здравословни храни за силна биоикономика и качество на живот“ 2018–2023 г., одобрена с Решение на МС № 577/17.08.2018 г.

Дисертационният труд е насрочен за защита със заповед на Ректора на СУ „Св. Климент Охридски“ и защита ще се проведе на г. от ч. пред Научно жури в състав:

1. ;
2. ;
3. ;
4. ;
5.

Съкращения

МКБ – млечнокисели бактерии
GRAS – Общопризнати като безопасни
QPS – Квалифицирана презумпция за безопасност
ФАО/FAO – Организация на ООН по прехрана и земеделие
СЗО/WHO – Световна здравна организация
FDA – Агенцията за контрол на храните и лекарствата
EFSA – Европейски орган за безопасност на храните
ГИТ – гастроинтестинален тракт
SML – лиопротекторна среда с 10 % обезмаслено мляко, 5 % лактоза и 2 % аскорбинова киселина
SMT – лиопротекторна среда с 10 % обезмаслено мляко, 5 % трехалоза и 2 % аскорбинова киселина
MRS – de Man-Rogosa-Sharpe бульон/агар
MH – Mueller-Hinton агар
ME – Malt extract бульон/агар
TYCSB – Tryptone Yeast Extract Cystine w/ Sucrose and w/o Bacitracin агар
BHI – Brain Heart Infusion бульон/агар
PBS – фосфатно буфериран физиологичен разтвор
BSA – говежди серумен албумин
ДНК – дезоксирибонуклеинова киселина
рНК – рибозомна рибонуклеинова киселина
PCR – полимеразна верижна реакция
EPSs – екзополисахариди
ROS – реактивни кислородни видове
BLAST – Basic Local Alignment Search Tool
MALDI-TOF MS – matrix-assisted laser desorption ionizing time-of-flight mass spectrometer
PMF – peptide mass fingerprint
MAP – множествена антибиотична резистентност
IgA – имуноглобулин А
NCBI – Национален център за биотехнологична информация (National Center for Biotechnology Information)
CLSI – Институт по клинични и лабораторни стандарти (Clinical & Laboratory Standard Institute)
SD – стандартно отклонение
CFU – колоно-образуващи единици

I. Увод

В последните десетилетия значително нараства научната дейност, насочена към изследване на пробиотичните микроорганизми. Редица научни изследвания са установили, че много пробиотични щамове от групата на млечнокисели бактерии (МКБ) оказват полезно въздействие при профилактика и терапия на инфекциозни заболявания в устната кухина. В хода на нарастващите изследвания са установени благоприятните свойства на пробиотичните щамове да взаимодействат с оралната микробиота и да поддържат здрав микробиален баланс.

МКБ включват голямо разнообразие от представители, които чрез дългата си пробиотична история, са станали част от живота на човека. Те се включват в неговото ежедневие под формата на естествено съдържащи ги продукти, хранителни продукти, преминали през процеси на ферментация с помощта на стартерни култури, както и различни хранителни добавки с пробиотична употреба. МКБ също колонизират естествено човешкия организъм като допринасят по различни начини за неговото здравословно състояние.

Оралният микробиом играе важна роля върху човешкото микробиално съобщество, както и върху човешкото здраве. Тъй като устната кухина е началната точка на гастро-интестиналния тракт (ГИТ), развитието на орални заболявания може да допринесе и до появата на системни заболявания. Поради това много научни изследвания насочват своята активност към изследване на процесите на инхибиране на патогенните микроорганизми и поддържат здравето в устната кухина.

Нивото на орална хигиена е от изключително значение и има съществено въздействие върху състава и състоянието на оралния микробиом. Поддържането на добро орално здраве се отразява върху способността на човека да се адаптира към физиологичните промени през целия си живот и да поддържа своето съзъбие и устна кухина чрез независима грижа за себе си. Пробиотиците с насочено действие към устната кухина могат успешно да се конкурират с патогенните микроорганизми и да повишат присъствието на полезните бактерии, като по този начин могат да допринесат положително най-вече за превенцията на орални заболявания, каквито са кариес, пародонтоза и халитоза, както и за терапията при тяхното възникване. Поради това, изследването на МКБ като естествени антагонисти на различни патогени, както и на техните полезни функционални свойства продължава да бъде от съществен интерес за съвременната наука. Също така изследванията на пробиотичните им възможности са от съществено значение за включването им в различни хранителни добавки с цел разработване на ефективни функционални продукти.

II. Цел и задачи

Целта на настоящия дисертационен труд е:

Изолиране, идентификация и характеризирание на нови щамове МКБ от оралната микробиота, оценка на техния пробиотичен потенциал, антимикробни взаимодействия и изследване на потенциала им за приложение в моделен пробиотичен продукт за орално здраве.

За постигане на зададената цел са формулирани задачи:

1. Изолиране и характеризирание на нови щамове МКБ от проби от човешкия орален микробиом.
 - 1.1. Определяне на основни морфологични и физиологични характеристики.
 - 1.2. Скрининг за ензимни активности на новоизолираните щамове МКБ.
2. Видова идентификация на новоизолираните щамове МКБ.
 - 2.1. Секвенционен анализ на гените за 16S рРНК.
 - 2.2. Белтъчни профилиране чрез MALDI-TOF MS система.
 - 2.3. Секвениране и биоинформатична обработка на цялостен геном.
3. Оценка за преживяемостта и динамика на развитие на изследваните щамове МКБ при симулирани условия на различните отдели на ГИТ.
 - 3.1. Оценка за преживяемостта на изследваните щамове МКБ в симулирани условия на устната кухина – приживяемост при орален стрес.
 - 3.2. Преживяемост при пряко въздействие на стресови фактори от ГИТ.
 - 3.3. Динамика на развитие в присъствие на стресови фактори от ГИТ.
4. Оценка на адхезивните способности на изследваните щамове МКБ.
 - 4.1. Автоагрегационна способност.
 - 4.2. Способност за свързване с муцин.
 - 4.3. Способност за образуване на собствен биофилм.
 - 4.4. Биоинформатичен анализ за наличие на белтъци адхезини.
5. Оценка на антибиотичната резистентност и биоинформатичен анализ за придобити гени резистентност при изследваните щамове МКБ.
6. Скрининг за антиоксидантен капацитет на изследваните щамове МКБ.
7. Антагонистична активност на изследваните щамове МКБ срещу тест-патогени, включително орални тест-патогени.
 - 7.1. Скрининг за антимикробна активност срещу тест-патогени и биоинформатичен анализ за наличие на гени за продукция на бактериоцини.

- 7.2. Антагонистична активност срещу орални тест-патогени в условия на ко-култивиране.
- 7.3. Коагрегациона способност с орални тест-патогени.
- 7.4. *In vitro* оценка на антибиофилмова активност срещу тест-патогени.
8. Преживяемост на изследваните щамове МКБ при процес на лиофилизация и съхранение.
9. Стабилност и преживяемост на подбрани щамове в различни формулировки на моделен продукт за орално здраве.
 - 9.1. Изчисляване на пробиотичен потенциал и селектиране на щамове за включване в състава на моделни пробиотични продукти.
 - 9.2. Оценка жизнеспособността на селектираните щамове при включване в различни моделни продукти в свежа форма.
 - 9.3. Оценка жизнеспособността на селектираните щамове при включване в моделен продукт в лиофилизирана форма;
 - 9.4. Оценка за наличие на странична микрофлора в готовите моделни продукти.

III. Материали и методи

1. Тест-микроорганизми

Bacillus cereus ATCC 11778, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 10231, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Propionibacterium acnes* (изолат), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

2. Хранителни среди и разтвори

Използвани са пряхообразни и гранулирани хранителни среди, приготвени според изискванията на производителя: de Man-Rogosa-Sharpe (MRS) бульон/агар (Merck; HiMedia); Mueller-Hinton (MH) агар (Merck); Malt extract (ME) бульон/агар (Oxoid); Tryptone Yeast Extract Cystine w/ Sucrose and w/o Bacitracin (TYCSB) агар (HiMedia); Brain Heart Infusion (BHI) бульон/агар (Sigma-Aldrich); HiCrome E. coli агар (HiMedia); Агар (Sigma-Aldrich); калиев перманганат (KMnO₄) агар; Разтвори: Физиологичен разтвор; Фосфатно буферизиран разтвор (PBS); електролитен солеви разтвор с добавен лизозим.

3. Изолиране, култивиране и съхранение на изследваните щамове

Изолиране на чисти култури МКБ от устната кухина на човек. Култивиране на новите изолати в MRS бульон и агар при оптимална температура. Съхранение на новите изолати в замразено състояние при -80°C и под лиофилизирано състояние.

4. Физиологични, генетични и биоинформатични методи

Оцветяване по Грам; Пероксидазна активност; Каталазна активност.

Изолиране на геномна ДНК с Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep Kit (Zymo Research); Идентификация чрез 16S рПНК секвенционен анализ с PuReTaq Ready-To-Go PCR Beads (Cytiva) и универсални праймери 27F и 1492R, секвениране на PCR продуктите от Macrogen Europe B. V., Холандия. Генерираните секвенции са анализирани за сравняване на нуклеотидните последователности чрез BLASTn алгоритъм в базата данни на NCBI; Цялостно геномно секвениране от Novogene Europe, Великобритания. Суровите данни са обработени чрез биоинформатичната платформа Galaxy Europe и анализирани чрез платформата MiGa Online за сравнение с базата данни за типови култури на NCBI и базата данни за прокариотни геноми; Получаване на белтъчен профил чрез MALDI-TOF MS QuanTOF (IntelliBio) система.

In silico биоинформатични анализи на цялостните геномни секвенции за наличие на адхезини и лектини чрез биоинформатичната платформа Galaxy Europe и BLASTx алгоритъм в базата данни на NCBI; скрининг за наличие на придобити гени за антибиотична резистентност в базата данни на NCBI; скрининг за наличие на гени за пептидазна активност в базата данни на NCBI; скрининг за наличие на гени за продукцията на бактериоцини в базата данни на NCBI.

Ензимна активност на изследваните щамове чрез API® ZYM strips (BioMérieux) тест-кит.

5. Преживяемост на изследваните щамове МКБ в симулирани условия на устната кухина

Изследване влиянието на моделен слюнчен разтвор върху изследваните щамове и отчитане на брой жизнеспособни клетки чрез определяне на CFU/mL.

6. Оценка за преживяемост и динамика на развитие на изследваните щамове МКБ в различните отдели на ГИТ

Преживяемост под влиянието на пепсин и рН 2 и отчитане на брой жизнеспособни клетки чрез определяне на CFU/mL; Динамика на развитие в присъствие на различни стресови фактори в ГИТ, включително лизозим, панкреатин и рН 7, различни концентрации на жлъчни соли.

7. Адхезивни способности на изследваните щамове МКБ

Способност за автоагрегация чрез определяне на оптична плътност (OD); способност за свързване с муцин чрез определяне на CFU/mL на адхезирали клетки; Способност за формиране на собствен биофилм чрез кристал виолетов метод.

8. Антибиотичната резистентност на изследваните щамове МКБ

Фенотипно определяне на чувствителност към антибиотици чрез диск-дифузионния метод на Кърби-Бауър. Интерпретация на резултатите според CLSI 2020.

9. Антиоксидантен капацитет на изследваните щамове МКБ

Тотален антиоксидантен капацитет чрез агаров метод с калиев перманганат (KMnO₄).

10. Антагонистични взаимодействия на изследваните щамове МКБ

Антибактериална активност срещу осем тест-патогена: *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. acnes*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis* and *S. mutans*; Антимикробна активност срещу дрождев тест-патоген *C. albicans*; Антагонистична активност срещу два асоциирани с орални заболявания тест-патогена *S. mutans* и *C. albicans* чрез метод за качествен инхибиторен потенциал и количествен метод на директен антагонизъм; Коагрегация с *S. mutans* и *C. albicans* чрез определяне на оптична плътност (OD); Антибиофилмова активност срещу *S. mutans* и *C. albicans* чрез кристал виолетов метод.

11. Технологични характеристики на изследваните щамове МКБ

Оценка на стабилността при процес на сублимационно сушене с две лиопротекторни среди и отчитане на брой жизнеспособни клетки чрез определяне на CFU/mL преди и след лиофилизация, и след 4 и 8 месеца съхранение при 4°C; Определяне на стабилността при процес на сублимационно сушене с подходяща за включване в моделен продукт лиопротекторна среда и отчитане на брой жизнеспособни клетки чрез определяне на CFU/mL преди и след лиофилизация.

12. Стабилност и преживяемост на селекция от изследваните щамове МКБ в различни формулировки на моделен продукт за орално здраве

Оценка на пробиотичния потенциал и селектиране на щамове за включване в състава на моделни продукти; Формулиране на продукти на какаова и агарова основа и включване на селектираните щамове като свежи култури и в лиофилизирана форма. Проби са съхранявани на 4°C и анализирани на 0, 10, 20, 30, 60 и 90 дни чрез отчитане на брой жизнеспособни клетки с определяне на CFU/mL; Присъствие на странична микрофлора в готовите моделни продукти чрез определяне на общ брой сапрофитни микроорганизми и присъствие на *E. coli*.

13. Обработка на данни

Експериментите са проведени в минимум три повторения и резултатите са представени като средни стойности \pm SD. Статистически анализи: two-tailed Student's t-test, Pearson correlation и One-way ANOVA, последван от post-hoc Tukey test.

IV. Резултати и обсъждане

1. Изолиране и характеризиране на нови щамове МКБ от проби от човешкия орален микробиом

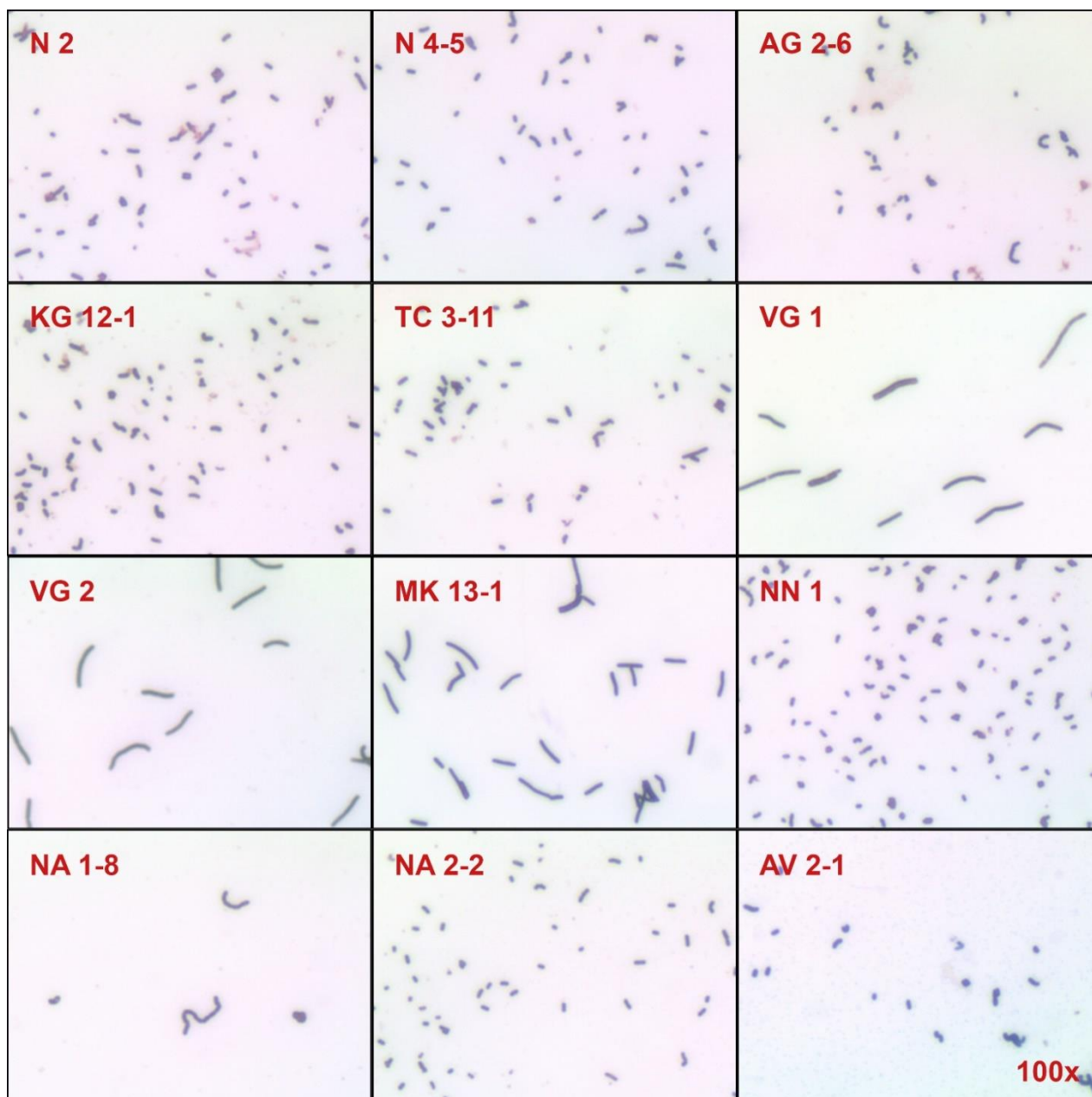
1.1. Определяне на основни морфологични и физиологични характеристики

МКБ и техните пробиотични свойства са обект на обширни изследвания, с цел да бъдат подбрани щамове с пробиотичен потенциал, които да бъдат успешно включени в различни пробиотични продукти за поддържане на човешкото здраве. Независимо от факта, че са установени спектър от щамове в доказани пробиотични характеристики, много изследователи продължават да се фокусират към изолиране на нови щамове, в зависимост от специфичната им цел на приложение (Un-Nisa et al., 2023).

За целите на изследователската работа в настоящия дисертационен труд са събрани 76 изходни проби от устната кухина на 16 доброволци без наличие на изразени орални заболявания. От тези проби са изолирани общо 64 изолата и са анилизирани чрез класически подход за обработка. За всички изолати са проведени тестове за определяне на клетъчна морфология, оцветяване по Грам, наличие на каталазна и пероксидазна ензимна активност. Според критериите за Гр (+) и отрицателни ензимни активности са подбрани дванадесет изолата с пръчковидна клетъчна морфология и Грам-положително оцветяване, които съответстват на основните характеристики на МКБ (Таблица 1, Фигура 1).

Таблица 1 – Основни морфологични и физиологични характеристики за първичен подбор на новоизолирани щамове от устна кухина на човек

Изолат	Клетъчна морфология	Оцветяване по Грам	Пероксидазна активност	Каталазна активност
N 2	пръчковидна	Грам+	-	-
N 4-5	пръчковидна	Грам+	-	-
AG 2-6	пръчковидна	Грам+	-	-
KG 12-1	пръчковидна	Грам+	-	-
TC 3-11	пръчковидна	Грам+	-	-
VG 1	пръчковидна	Грам+	-	-
VG 2	пръчковидна	Грам+	-	-
MK 13-1	пръчковидна	Грам+	-	-
NN 1	пръчковидна	Грам+	-	-
NA 1-8	пръчковидна	Грам+	-	-
NA 2-2	пръчковидна	Грам+	-	-
AV 2-1	пръчковидна	Грам+	-	-



Фигура 1 – Морфология на новоизолираните щамове от устна кухина на човек

1.2. Скрининг за ензимни активности при изследваните щамове МКБ

За потенциалните пробиотични щамове е от изключителна важност да бъде оценена синтезата на определени ензими, за да се потвърди, че не продуцират токсични вещества. Продуцирането на полезни ензими и отсъствието на увреждащи ензими са специфични характеристики, които зависят от видовата принадлежност и щамовите специфики. Едни от важните групи ензимни активности, които се проследяват при МКБ са β -галактозидазната активност, чрез която се допринася за подобряване усвояването на лактоза, както и пептидазните активности, които могат да имат отношение към продукцията на биоактивни пептиди с различни свойства. Важно е да се подчертае, че видове/щамове, при които се установяват специфични ензимни

активности, свързани с продуциране на потенциално токсични вещества трябва да бъдат изключвани при първичните селекции на потенциално пробиотични щамове. За определяне на ензимния профил на изследваните щамове е използвана API® ZYM системата, като резултатите са представени чрез скала за полуколичествено оценяване на изявените ензимни активности, съгласно препоръките на производителя (Таблица 2).

Всички тествани щамове проявяват много добре изразена левцин ариламидазна ензимна активност и добре изразени киселофосфатазна и β - активности. Отчетени са също валин ариламидаза, α -химотрипсин, α - галактозидаза и α -глюкозидаза при повечето от изследваните щамове. При всички щамове са отчетени по-ниски естеразна и етеро-липазна активности. При всички тествани щамове не се отчитат ензимни активност за трипсин, β -глюкоронидаза, N-ацетил- β -глюкозаминидаза, и α -манозидаза .

В изследване на Kim et al., са оценени щамове от видовете *L. rhamnosus* и *L. paracasei*, които са показали висока левцин ариламидазна активност и не е отчетена β -глюкоронидазна и α -манозидазна активност (Kim et al., 2021). Според нивото на експресия на ариламидазни активности се определя протеолитичната активност на бактериалните щамове (Mudryk and Podgórska, 2006). Високата продукция на левцин ариламидаза и добре изразени щамово специфични валин и цистин ариламидазни активности обуславят изразена протеолитична активност при изследваните щамове.

Важно е също да се отбележи, че β -глюкоронидазата е бактериален ензим, който се асоциира със синтеза на определени канцерогенни вещества, както и с неблагоприятни въздействия върху черния дроб и дебелото черво (Song et al., 2020). Според получените резултати, при изследваните щамове МКБ не е отчетена β -глюкоронидазна ензимна активност (Таблица 2). Първичният скрининг за основни ензимни активности също допринася за предварителния подбор на щамовете за последващи изследвания на техния пробиотичен потенциал, тъй като подобни щамове не трябва да проявяват нежелани активности.

2. Видова идентификация на новоизолираните щамове МКБ

За потенциалното бъдещо приложение в различни продукти, включително пробиотични, задължително условие е всички новоизолирани бактериални щамове да бъдат пълноценно охарактеризирани (Sanders, 2008b). За да бъде определен като пробиотичен кандидат е задължително всеки щам да бъде коректно идентифициран до видова принадлежност съгласно международно приетите методи и номенклатура (Parker et al., 2019).

За идентифициране на новоизолираните щамове до вид е използвана комбинация от съвременни методи, включваща секвенционен анализ за гена за 16S рРНК, получаване на белтъчен профил чрез MALDI-TOF MS и идентификация, и секвениране на цялостен геном и биоинформатична обработка за установяване на гени за определени характеристики.

Таблица 2 – Определяне на ензимни активности при новоизолираните щамове МКБ.

Ензим	N 2	N 4-5	AG 2-6	KG 12-1	TC 3-11	VG 1	VG 2	MK 13-1	NN 1	NA 1-8	NA 2-2	AV 2-1
Алкална фосфатаза	1	1	2	2	1	0	0	0	0	1	1	3
Естераза (C4)	2	3	1	3	2	1	2	2	3	3	3	2
Естеразна липаза (C8)	2	3	1	2	2	1	1	2	2	2	2	2
Липаза (C14)	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2
Левцин ариламидаза	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Валин ариламидаза	3	3	2	5	3	3	2	2	3	5	3	5
Цистин ариламидаза	3	3	2	2	3	2	2	2	2	3	2	3
Трипсин	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
α -химотрипсин	0	0	3	3	0	4	4	4	4	4	4	3
Кисела фосфатаза	5	4	5	5	4	3	3	3	4	3	3	4
Нафтол-AS-BI-фосфохидролаза	1	1	4	5	1	4	2	3	5	4	4	2
α -галактозидаза	4	5	2	1	5	4	3	3	5	3	5	0
β -галактозидаза	5	5	1	5	5	2	2	4	5	3	5	5
β -глюкоронидаза	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
α -глюкозидаза	0	0	4	5	5	5	5	5	4	5	3	5
β -глюкозидаза	0	0	1	3	0	3	3	3	4	3	1	3
N-ацетил- β -глюкозаминидаза	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
α -манозидаза	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
α -фукозидаза	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0

Сравнението на нуклеотидните последователности на гена за 16S рРНК в базата данни на NCBI показва висок процент на идентификация на всички дванадесет щамове, с над 98.7 %. Последващата идентификация чрез секвениране и анализиране на цялостния геном на изследваните щамове също показва висок процент на идентификация, над 97.9 %. Независимо от процентните различия при двата подхода за отделните щамове, трябва да се вземе предвид големината на нуклеотидната последователност, както на гена за 16S рРНК, така и на цялостния геном, което определя резултатите и от двата подхода като такива с висока достоверност на идентификация (Таблица 3).

Идентификацията на щамовете е потвърдена и от получените белтъчни профили чрез MALDI-TOF MS системата, сравнени на най-близките по сходство белтъчни профили в базата данни на приложението QuanID Microbial Test. При получените белтъчни профили за всички щамове е отчетено съответствие за вид с идентификационен резултат над 1000, което се счита за високо достоверна идентификация.

След изпълнената идентификация на новоизолираните щамове, данните на обработените цели геномни секвенции са депозираны в генетичната база данни за цели геноми на NCBI (Таблица 4; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA991968>), с което се допринася за обогатяване на информационните масиви от данни за щамове МКБ.

След провеждане на анализите, новоизолираните щамове са идентифицирани като представители на различни родове МКБ. Според новоприетата номенклатура за семейство *Lactobacillaceae* (Zheng et al., 2020), щамовете са идентифицирани като принадлежащи към видовете *Limosilactobacillus fermentum*, *Latilactobacillus curvatus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *sunkii*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Lacticaseibacillus paracasei* и *Weissella confusa* (Таблица 3).

Определянето на нуклеотидните последователности на гена за 16S рРНК и цялостния геном дава възможност за разнообразие от приложения, като видово определяне и провеждане на филогенетични анализи, типизиране на значими клинични и индустриални бактериални и др. щамове (Salem-Bango et al., 2023), различни биоинформатични анализи. Независимо, че идентификацията на микроорганизми чрез гена за 16S рРНК е един от най-застъпените методи, в последните години MALDI-TOF MS системите се доказват като високо надеждно и бързо за приложение средство за идентификация и класификация (Singhal et al., 2015) и все по-широко се използват, както в научните изследвания, така и в практиката (Jussiaux et al., 2021). Получените резултати при MALDI-TOF MS анализа на новоизолираните щамове МКБ предоставят точно потвърждение на резултатите от генетичните анализи за идентификация (Таблица 3).

Таблица 3 – Таксономично характеризиране на новоизолираните щамове МКБ

Щам	16S рДНК секвениране	%	Цялостно геномно секвениране	%	MALDI-TOF MS	Резултат
N 2	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	99.7	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	99.1	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	1586
N 4-5	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	99.6	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	99.1	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	1822
AG 2-6	<i>Weissella confusa</i>	99.4	<i>Weissella confusa</i>	97.9	<i>Weissella confusa</i>	1837
KG 12-1	<i>Latilactobacillus curvatus</i>	99.6	<i>Latilactobacillus curvatus</i>	98.8	<i>Latilactobacillus curvatus</i>	1189
TC 3-11	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	99.6	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	99.3	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	1234
VG 1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>sunkii</i>	98.9	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	98.3	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	1324
VG 2	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	98.7	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	98.3	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	1676
MK 13-1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	99.1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	98.8	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	1193
NN 1	<i>Weissella confusa</i>	99.5	<i>Weissella confusa</i>	98.0	<i>Weissella confusa</i>	1490
NA 1-8	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	99.9	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	99.2	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	1324
NA 2-2	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	99.1	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	99.5	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	2774
AV 2-1	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	99.8	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	98.6	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	5533

Таблица 4 – Депозирани цели геномни секвенции на новоизолираните щамове МКБ

Щам	BioSample достъп	Геномен достъп
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> N 2	SAMN36329510	JAUJFN000000000
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> N 4-5	SAMN36329511	JAUJFO000000000
<i>Weissella confusa</i> AG 2-6	SAMN36329512	JAUJFP000000000
<i>Latilactobacillus curvatus</i> KG 12-1	SAMN36329513	JAUJFQ000000000
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> TC 3-11	SAMN36329514	JAUJFR000000000
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>sunkii</i> VG 1	SAMN36329515	JAUJFS000000000
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> VG 2	SAMN36329516	JAUJFT000000000
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> MK 13-1	SAMN36329517	JAUJFU000000000
<i>Weissella confusa</i> NN 1	SAMN36329518	JAUJFV000000000
<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> NA 1-8	SAMN36329519	JAUJFW000000000
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> NA 2-2	SAMN36329520	JAUJFX000000000
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> AV 2-1	SAMN36329521	JAUJFY000000000

С цел допълване на информацията за ензими активности при изследваните щамове с получените целогеномни последователности са проведени *in silico* анализи за наличие на пептидазни генетични детерминанти и са установени различни гени за пептидазни активности. Установените гени са част от *Per* семейството на хидролазни ензими, които осъществяват хидролиза на белтъци, включително дипептиди, трипептиди и олигопептиди, до аминокиселини (Таблица 5). Протеолитичните активности при МКБ обуславят снабдяването с есенциалните за тяхното развитие аминокиселини, като паралелно с това в резултат на изявата на специфични активности могат да се продуцират различни вещества, благоприятстващи здравето състояние при човека (Wang et al., 2021).

Таблица 5 – Установени гени за пептидазна активност при изследваните щамове МКБ.

Щам	perA	perC	perF	perQ	perT	perV
<i>L. fermentum</i> N 2			+		+	+
<i>L. fermentum</i> N 4-5			+		+	+
<i>W. confusa</i> AG 2-6	+		+		+	+
<i>L. curvatus</i> KG 12-1			+		+	+
<i>L. fermentum</i> TC 3-11					+	+
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>sunkii</i> VG 1		+	+	+	+	+
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> VG 2			+		+	
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> МК 13-1		+	+	+	+	+
<i>W. confusa</i> NN 1	+		+		+	+
<i>L. rhamnosus</i> NA 1-8						+
<i>L. fermentum</i> NA 2-2			+		+	+
<i>L. paracasei</i> AV 2-1			+		+	+

Ендопептидазна система при МКБ се състои от аминокептидазите (*PerN*, *PerC*, *PerM* и *PerA*), ендопептидазите (*PerE*, *PerF* и *PerO*); дипептидазите (*PerV* и *PerD*), трипептидазата *PerT*; пролин пептидазите (*PerX*, *PerP*, *PerQ*, *PerR* и *PerI*). В казеиновите хидролизати са открити много пептиди с важни физиологични функции, като опиоиден пептид, пептид за понижаване на кръвното налягане, антитромботичен пептид, пептид, стимулиращ имунитета, пептид, насърчаващ абсорбцията на минерални йони и др., като тези пептиди са около 1000 Da и лесно се абсорбират в долните отдели на ГИТ (Dimitrov et al., 2015; Zhang et al., 2022). Наличието на пептидазни активности с потенциал за продуциране на биологично активни пептиди е значима характеристика, която допълва пробиотичните свойства при различните щамове МКБ.

3. Оценка за преживяемостта и динамика на развитие на изследваните щамове МКБ при симулирани условия на различните отдели на ГИТ

3.1. Оценка за преживяемостта на изследваните щамове МКБ в симулирани условия на устната кухина – приживяемост при орален стрес

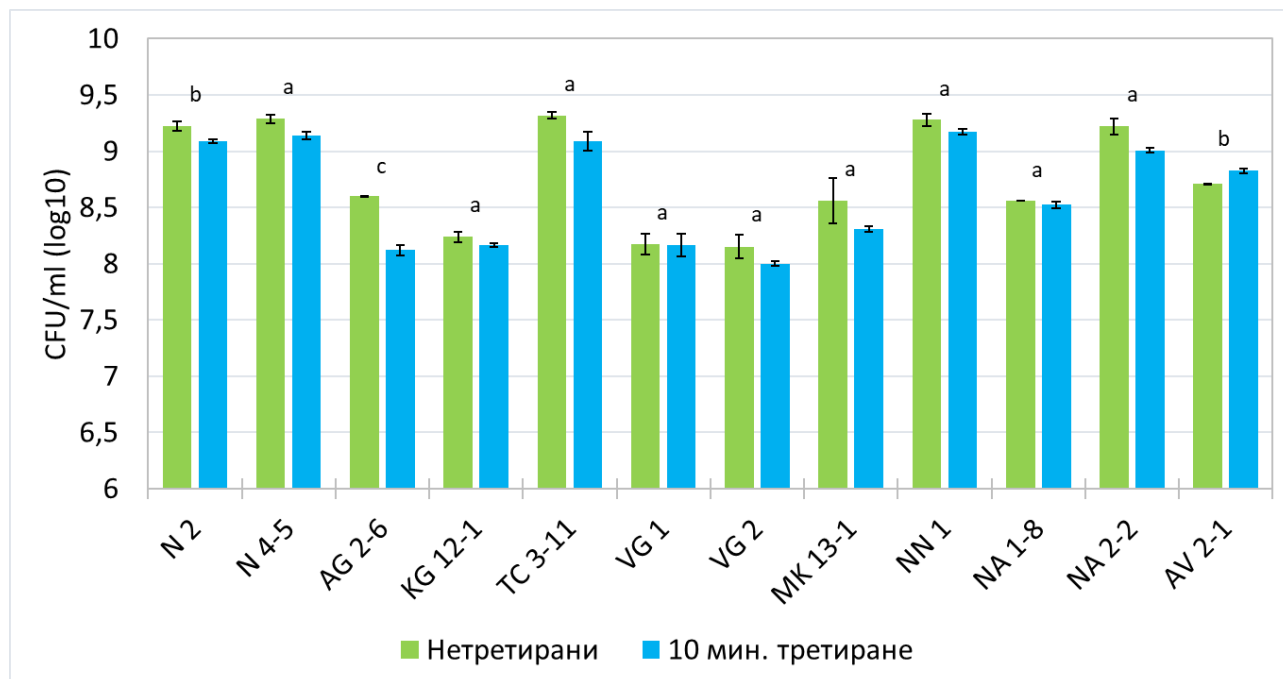
Устната кухина е входът на ГИТ и приетите пробиотични микроорганизми първоначално са изложени на въздействието на слюнката. При този първи контакт с гостоприемника, оцеляването и устойчивостта на бактериите към факторите на околната среда в устната кухина са от първостепенно значение. Слюнчените белтъци, каквито са лизозим, слюнчена пероксидаза, лактоферин, хистатин, цистатини и секреторен IgA могат да повлияят върху жизнеспособността или активността на пробиотичните щамове. Влиянието на слюнката върху установяването на бактериите може, както да инхибира, така и да промотира колонизацията (Bosch et al., 2003). Предварителното третиране на МКБ с лизозим може слабо да повиши адхезивността им, което обаче може да повлияе дори и в ниска степен на тяхната жизнеспособност (Stamatova et al., 2009).

За да се оцени преживяемостта на изследваните щамове в различните отдели на ГИТ при човека, са проведени *in vitro* анализи за определяне на тяхната устойчивост симулирани условия. Целта на оценката за преживяемост в стимулирани орални условия е да се установи ефекта на наподобяващият слюнка електролитен разтвор върху преживяемостта на изследваните щамове след техния прием в устната кухина (Фигура 2). Според получените резултати може да се определи, че след третиране с моделния слюнчения разтвор, при всички изследвани щамове се наблюдава много добра преживяемост, като се запазва CFU/mL без статистически значими изменения спрямо нетретираните проби.

При изследване на Haukioja et al. е оценена *in vitro* преживяемостта и адхезията към орални повърхности на пробиотични щамове от родовете *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*. Всички изследвани от тях щамове са показали висока преживяемост, но с варираща адхезия, като при тези от род *Lactobacillus* са експресирани високи адхезивни способности (Haukioja et al., 2006). *In vitro* проучванията отчитат, че представители на *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* не могат да се развият в слюнката, но могат да запазят жизнеспособността си за 24 часа в тази среда. В друго свое изследване същите автори посочват, че предварителното третиране с лизозим значително е понижило адхезията на *L. rhamnosus* Lc705, *L. rhamnosus* GG и *L. casei* Shirota, но адхезивните способности на *Lactobacillus johnsonii* La1 и *B. lactis* BB-12 останали непроменени (Haukioja et al., 2008).

Тъй като всички изследвани щамове са изолати от устната кухина, е очакван резултат установената им способност да могат да преживяват при въздействие на слюнката. Тези резултати показват висока степен на потенциална преживяемост в условията на устната кухина, което е предпоставка за тяхната способност да се конкурират с орални патогени, както и успешно да се интегрират в състава на

денталния биофилм и да проявяват пробиотичните си свойства в тази входна точка на ГИТ.



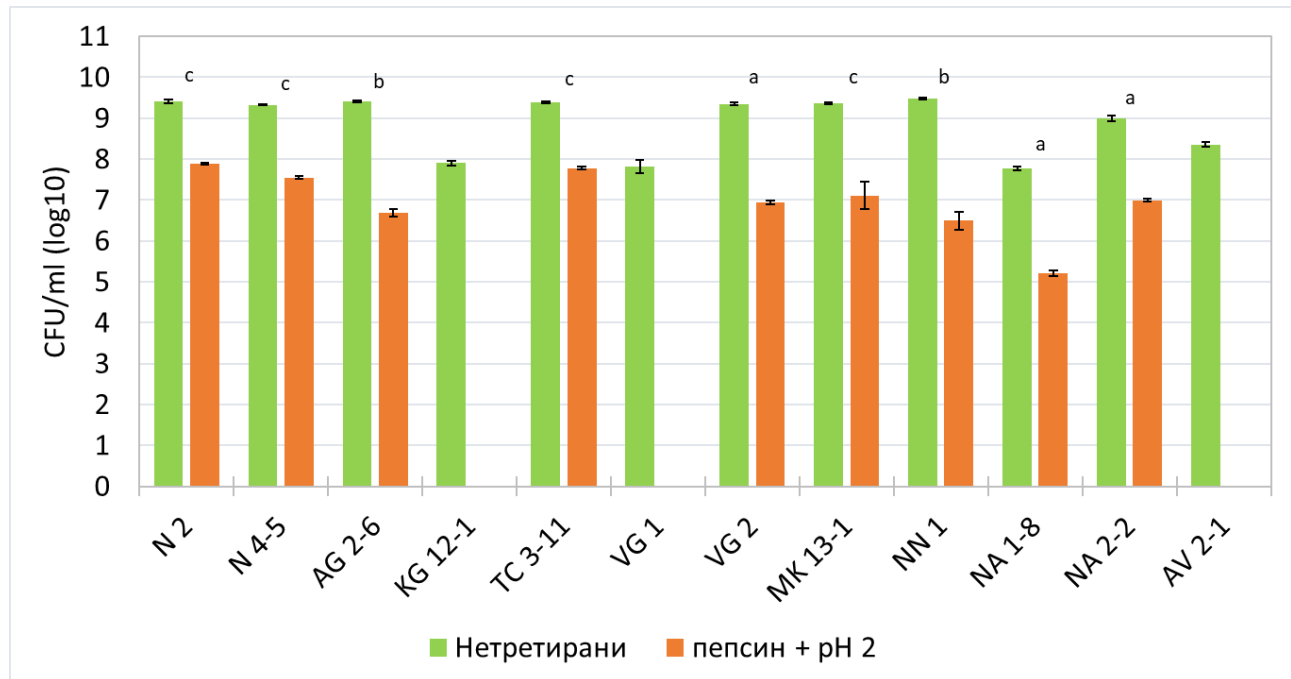
Фигура 2 – Преживяемост на изследваните щамове МКБ при симулирани условия на устната кухина. Представени са средните стойности \pm стандартно отклонение (SD). Two-tailed Student's t-test: a – $p > 0.05$; b и c – $p < 0.05$ и $p < 0.01$, съответно. Щамове: *L. fermentum* N 2, *L. fermentum* N 4-5, *W. confusa* AG 2-6, *L. curvatus* KG 12-1, *L. fermentum* TC 3-11, *L. delbrueckii* subsp. *sunkii* VG 1, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* VG 2, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* МК 13-1, *W. confusa* NN 1, *L. rhamnosus* NA 1-8, *L. fermentum* NA 2-2 и *L. paracasei* AV 2-1.

3.2. Преживяемост при пряко въздействие на стресови фактори от ГИТ

Трансфера на орално приетите пробиотични микроорганизми от устната кухина към следващите отдели на ГИТ е силно вероятен, поради което е нужно да се направи оценка на тяхната преживяемост и потенциал на развитие при наличие на стресови фактори, характерни за следващите отдели на ГИТ.

Целта на оценката за преживяемост в присъствие на пепсин и рН 2 е да се определи степента на устойчивост на изследваните МКБ при попадане в условията на стомашната среда (Фигура 3). Резултатите показват, че при повечето от изследваните щамове се наблюдава понижаване на CFU/mL с 2 до 3 логаритмични порядъка. Такива са резултатите, отнасящи се за щамове *L. fermentum* N 2, N 4-5, TC 3-11 и NA 2-2, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* МК 13-1 и *L. rhamnosus* NA 1-8, при които се наблюдава понижаване с два порядъка, докато при щамове *W. confusa* AG 2-6 и NN 1 и *L. delbrueckii* subsp. *lactis* VG 2 се наблюдава понижаване с три порядъка в рамките на експеримента. При щамовете *L. curvatus* KG 12-1, *L. delbrueckii* subsp. *sunkii* VG 1 и *L. paracasei* AV 2-1 се наблюдава висока чувствителност към симулирани условия на

стомаха, присъствието на пепсин и рН 2, като при тях не са отчетени жизнеспособни клетки в края на експеримента.



Фигура 3 – Преживяемост на изследваните щамове МКБ в присъствие на пепсин при рН 2. Представени са средните стойности \pm SD. Two-tailed Student's t-test: a – $p > 0.05$; b и c – $p < 0.05$ и $p < 0.01$, съответно. Щамове: *L. fermentum* N 2, *L. fermentum* N 4-5, *W. confusa* AG 2-6, *L. curvatus* KG 12-1, *L. fermentum* TC 3-11, *L. delbrueckii* subsp. *sunkii* VG 1, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* VG 2, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* МК 13-1, *W. confusa* NN 1, *L. rhamnosus* NA 1-8, *L. fermentum* NA 2-2 и *L. paracasei* AV 2-1.

Ниските нива на рН в стомаха и антимикробния ефект на храносмилателния ензим пепсин проявяват бариерно действие, като намаляват възможността на МКБ да преживеят в условията на ГИТ. Поради това, че естественият им произход е устната кухня, възможността някои щамове да не устоят ниското рН и присъствието на пепсин е с висока вероятност. Получените резултати от експеримента посочват, че девет от всички изследвани щамове проявяват значителна способност за преживяване, което благоприятства възможността да запазят жизнеспособност при стресовите условия в стомаха и да преминават към долните отдели на ГИТ.

Редица автори докладват за изразена чувствителност на много МКБ щамове към ензимната активност и високата киселинност в условията на стомаха. Mantzourani et al. отчетели понижаване жизнеспособността на редица от изследвани от тях МКБ с 2–5 логаритмични порядъка (Mantzourani et al., 2019). В изследване на Tokatli et al., авторите са оценили преживяемостта на група щамове МКБ и докладвали понижаване на клетъчната жизнеспособност с до четири порядъка (Tokatli et al., 2015).

3.3. Динамика на развитие в присъствие на стресови фактори от ГИТ

За да могат да преживяват и да запазват своята активност, както в устната кухина, така и в ГИТ, потенциалните пробиотични МКБ трябва да проявяват устойчивост спрямо стресовите условия и в горните и долните отдели на ГИТ. Фактори, като лизозим, панкреатин, жлъчни соли и различни стойности на рН могат да повлияят в значима степен както жизнеспособността, така и способността за развитие на щамовете МКБ. За да се оцени способността на изследваните щамове да се развиват в присъствие на различни стресови фактори са проведени серия от експерименти.

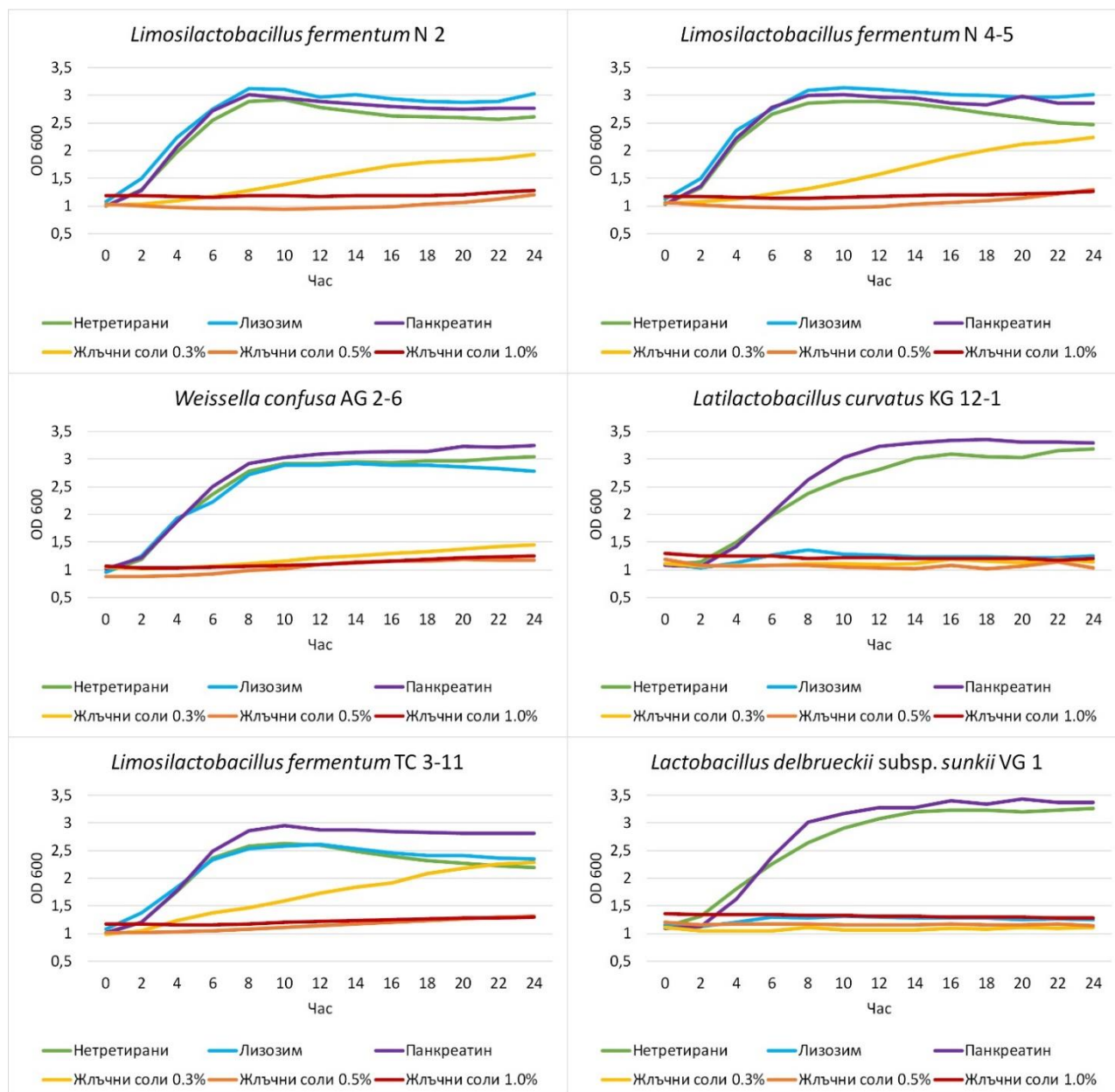
При наличие на стресов фактор лизозим, при осем от изследваните щамове се наблюдава динамика на развитие сходна с контролните варианти на култивиране, докато при четири щамове *L. curvatus* KG 12-1, *L. delbrueckii* subsp. *sunkii* VG 1, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* VG 2 и МК 13-1 не се отчита растеж (Фигури 4.1; 4.2). Независимо, че средата с лизозим повлиява нормалното развитие на тези четири щамове, то те показват висока степен на преживяемост при тези условия (Фигура 2).

В следствие на оралния си произход, изследваните щамове проявяват висока адаптивност в присъствието на лизозим, което определя потенциал за продължително присъствие в устната кухина и възможност за проява на пробиотичните им свойства. В изследвания на Fang et al. и Jia et al. са докладвани високи нива на толерантност от страна на щамове *Lactobacillus* при култивирането им в среда с присъстващи различни концентрации на лизозим (Fang et al., 2018; Jia et al., 2019). Bosch et al. са изследвали ефекта на вариращи концентрации на лизозим върху развитието на щамове МКБ и са отчетели растежни зависимости в диапазона 95.86–49.12 % (Bosch et al., 2012).

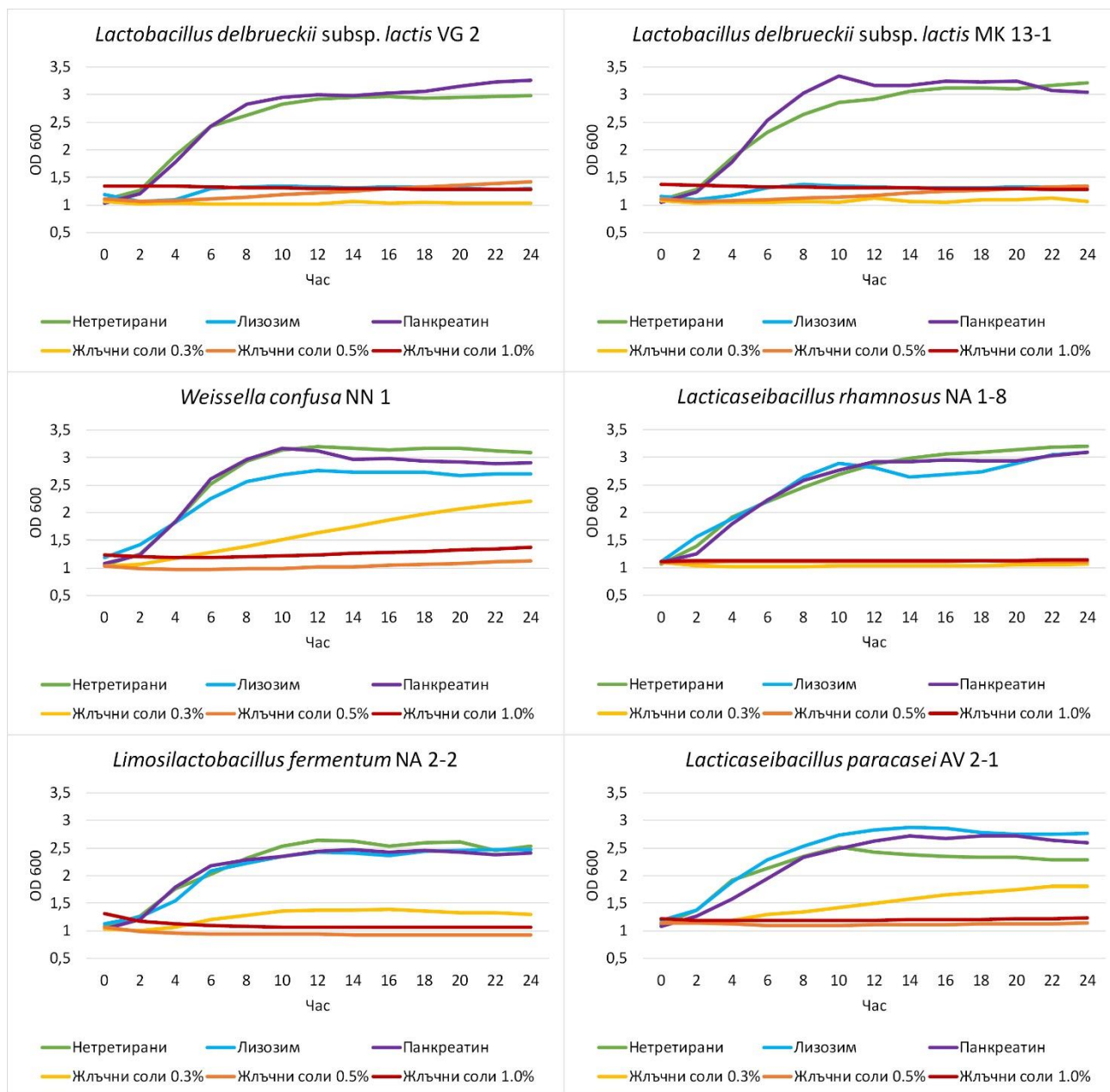
Проведен е също експеримент за проследяване на динамиката на развитие на изследваните щамове в присъствие на панкреатин при рН 7 (Фигури 4.1; 4.2). Резултатите показват, че в присъствието на панкреатични ензими не повлияват нормалното развитие на изследваните щамове. Наблюдаваните растежни характеристики в среда с добавен панкреатин показват много добра възможност за адаптиране на щамовете при тези условия. Khagwal et al. също са отчетели висока резистентност към панкреатин в концентрация 0.5 % при всички щамове МКБ, включени в тяхното проучване (Khagwal et al., 2014).

Експериментът за проследяване на динамиката на развитие на щамовете в присъствие на жлъчни соли е проведен, за да се оцени влиянието на различни концентрации на жлъчни соли, които се отделят с жлъчния сок в дуоденома и са важен фактор при храносмилателните процеси в ГИТ (Фигури 4.1; 4.2). При концентрация от 0.3 % се наблюдава понижаване на развитието при щамовете *L. fermentum* N 2, N 4-5, ТС 3-11 и NA 2-2, *W. confusa* AG 2-6 и NN 1 и *L. paracasei* AV 2-1, като до края на експеримента е отчетена по-ниска оптична плътност на културите спрямо контролните варианти. Докато при щамовете *L. curvatus* KG 12-1, *L. delbrueckii* subsp. *sunkii* VG 1, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* VG 2 и МК 13-1 и *L. rhamnosus* NA 1-8 се наблюдава инхибиране на растежа. При третиране с жлъчни соли в по-високи концентрации от 0.5 % и 1.0 % е отчетено значително инхибиране на развитието на всички щамове МКБ. Поради това, че при нормални физиологични условия концентрацията на жлъчни соли е около

0.3 % (Jose et al., 2015), получените резултати показват, че седем от изследваните щамове могат да преодолеят ефекта на жлъчните соли и да се развият при концентрация от 0.3 %. Установено е, че чувствителността при различни концентрации на жлъчни соли е видово и щамово зависим фактор (Montville and Matthews, 2012). В изследване на Alameri et al., авторите са отчетели 50–60 % развитие на изследваните от тях щамове МКБ, сравнено с контролните варианти, след 6-часово култивиране в среда с добавени жлъчни соли (Alameri et al., 2022). Щам *Lactobacillus*, изследван от Aarti et al., показал висока толерантност при 36-часово култивиране в среда с жлъчни соли (Aarti et al., 2018).



Фигура 4.1. – Динамика на развитие на изследваните щамове *L. fermentum* N 2, *L. fermentum* N 4-5, *W. confusa* AG 2-6, *L. curvatus* KG 12-1, *L. fermentum* TC 3-11 и *L. delbrueckii* subsp. *sunkii* VG 1 в присъствие на стресови фактори от ГИТ.



Фигура 4.2. – Динамика на развитие на изследваните щамове *L. delbrueckii* subsp. *lactis* VG 2, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* МК 13-1, *W. confusa* NN 1, *L. rhamnosus* NA 1-8, *L. fermentum* NA 2-2 и *L. paracasei* AV 2-1 в присъствие на стресови фактори от ГИТ.

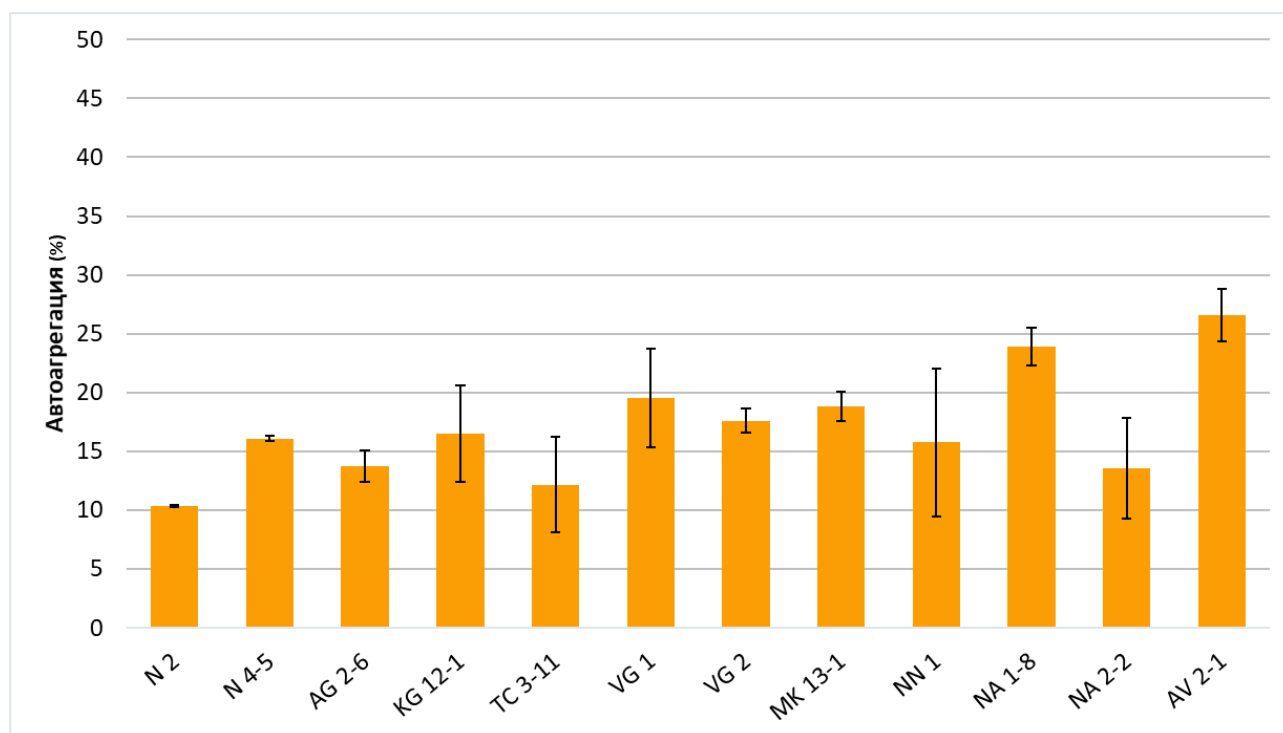
Като обобщение на резултатите от проведените експерименти за оценка на преживяемостта и способността за развитие в присъствие на различни стресови фактори от ГИТ може да се посочи, че тези характеристики не се определят от видовата принадлежност, а са щамово специфични.

4. Оценка на адхезивните способности на изследваните щамове МКБ

4.1. Автоагрегационна способност

Способността за адхезия към епителните клетки в ГИТ е сметено за първото основно свойство на МКБ, чрез което проявяват своите благоприятни ефекти върху здравето на гостоприемника. Изразените адхезивни способности могат да подпомогнат за промотиране на времепрестоя на МКБ в ГИТ, потискане развитието на потенциални патогенни микроорганизми и осигуряване на защитни функции на епителните клетки (Guan et al., 2020).

Оценен е потенциалът за автоагрегация на изследваните щамове като получените резултати показват, че всички щамове проявяват автоагрегационни свойства в диапазона 10.3–26.6 % при 4-часова инкубация (Фигура 5).



Фигура 5 – Автоагрегационна способност на изследваните щамове МКБ. Представени са средните стойности \pm SD. Щамове: *L. fermentum* N 2, *L. fermentum* N 4-5, *W. confusa* AG 2-6, *L. curvatus* KG 12-1, *L. fermentum* TC 3-11, *L. delbrueckii* subsp. *sunkii* VG 1, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* VG 2, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* МК 13-1, *W. confusa* NN 1, *L. rhamnosus* NA 1-8, *L. fermentum* NA 2-2 и *L. paracasei* AV 2-1.

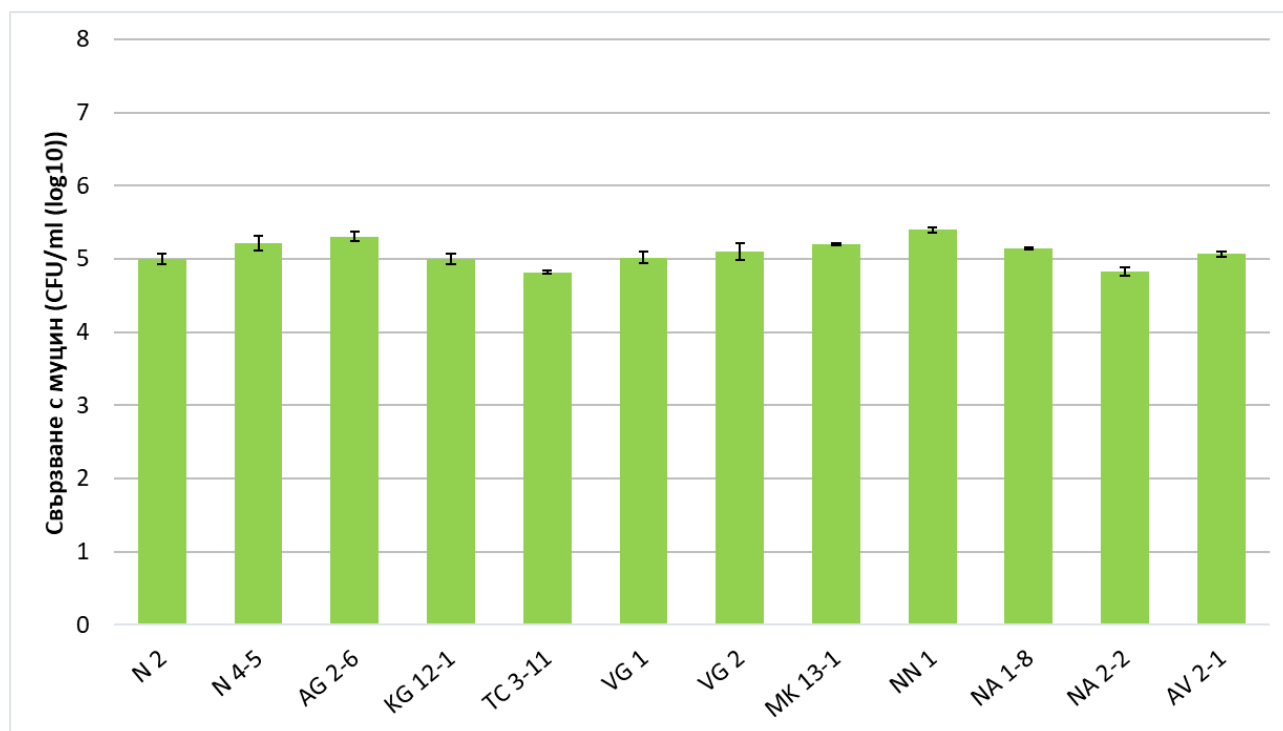
Най-високата автоагрегационна способност е отчетена при щамовете *L. delbrueckii* subsp. *sunkii* VG 1, *L. rhamnosus* NA 1-8 и *L. paracasei* AV 2-1. Автоагрегационните свойства на всички останали изследвани щамове са отчетени под 20 %. Нужно е да се вземе под внимание, че условията на експеримента, като възраст на културата, време и температура на провеждане са от значение за определяне на способността за автоагрегация. Наблюдаваните вариращи нива на автоагрегация между щамовете са резултат от комплексни взаимодействия между различните молекули по клетъчната

повърхност, като белтъци и полизахариди (Li et al., 2020), като това свойство се счита за щамовоспецифичен признак (Trunk et al., 2018). В други научни изследвания също е определен различен автоагрегационен потенциал, като при 22 щама *Lactobacillus* са установени автоагрегационни свойства в диапазона 24–41 % (Tuo et al., 2013), а при други няколко щама от същия род е отчетена автоагрегация в диапазона 15–21 % (Campana et al., 2017).

4.2. Способност за свързване с муцин

Мукозният слой на ГИТ е първоначалния контакт на пробиотичните микроорганизми с гостоприемника, който осигурява подходяща среда за развитие на микробиотата. Адхезията към мукозната повърхност е една от важните предпоставки за колонизацията на МКБ в ГИТ, което им дава конкурентно предимство в тази екосистема (Nishiyama et al., 2016).

За да се определи способността на изследваните щамове за адхезия към високомолекулни белтъци, експресиращи се по повърхността на мукозната тъкан, е проведен *in vitro* анализ за способност за свързване с муцин. Резултатите показват, че всички щамове проявяват изразена способност за свързване към муцин (Фигура 6).



Фигура 6 – Способност на изследваните щамове МКБ за свързване към муцин. Представени са средните стойности \pm SD. Щамове: *L. fermentum* N 2, *L. fermentum* N 4-5, *W. confusa* AG 2-6, *L. curvatus* KG 12-1, *L. fermentum* TC 3-11, *L. delbrueckii* subsp. *sunkii* VG 1, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* VG 2, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* MK 13-1, *W. confusa* NN 1, *L. rhamnosus* NA 1-8, *L. fermentum* NA 2-2 и *L. paracasei* AV 2-1.

При дест от изследваните щамове способността за свързване с муцин се определя като висока с 10^5 cfu/ml, като само при два от щамовете е от порядък на 10^4 cfu/ml, но значително се доближава до основната група.

В изследване на Monteiro et al., авторите докладват сходни свойства за свързване с муцин за щамове от видовете *L. plantarum* и *L. fermentum* (Monteiro et al., 2019).

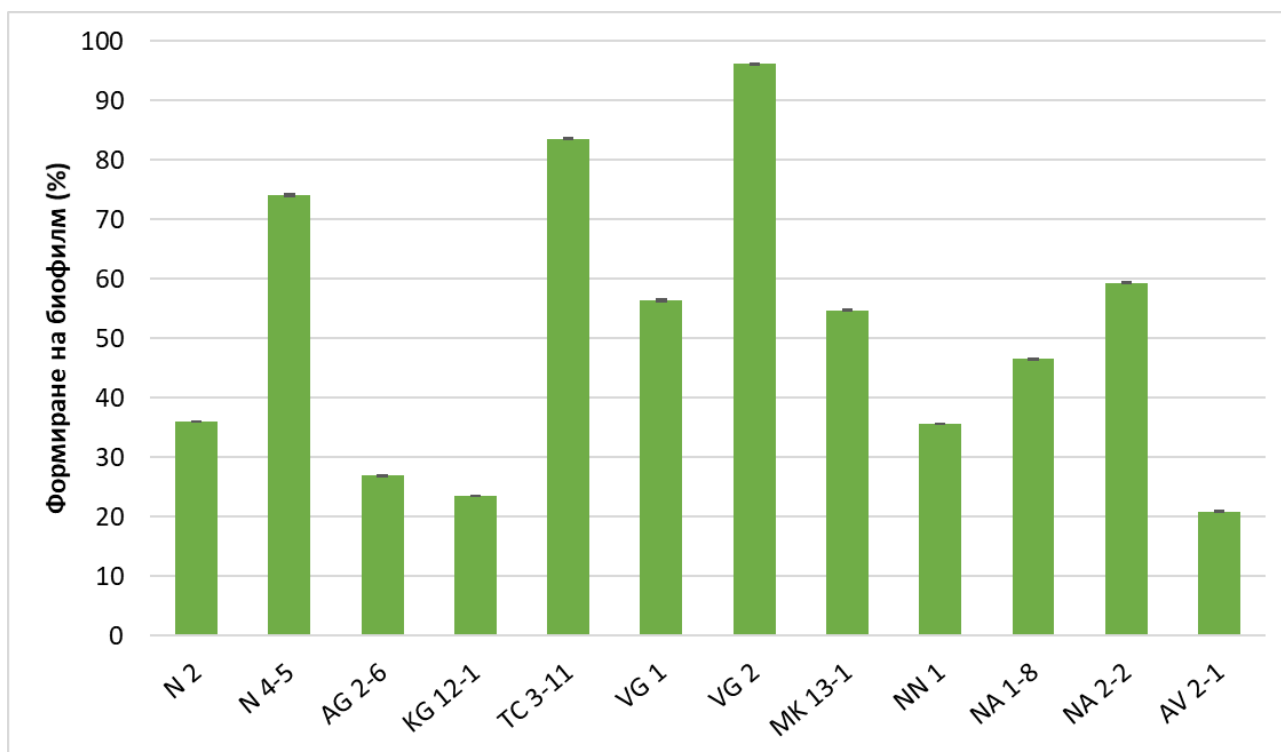
Способността изследваните щамове да адхезират с муцинови белтъци обуславя възможността им да се адаптират и да колонизират в различните среди на ГИТ и да проявяват пробиотичните си свойства. Така оценената адхезивна способност на щамовете определя техния потенциал за успешна колонизация *in vivo*, като получените резултати са важни за дефиниране на пробиотичния потенциал на щамовете и за бъдещата им употребата в пробиотични продукти. Поради оралния произход на изследваните щамове установената адхезионна способност е много добра предпоставка за адхезия към оралната епителна тъкан, чрез което те да бъдат успешно интегрирани в състава на оралната микробиота и да проявяват своите пробиотични свойства.

4.3. Способност за образуване на собствен биофилм

Образуването на собствен биофилм е важен механизъм, с който МКБ осъществяват своите пробиотични свойства чрез адхезия и натрупване на биомаса върху тъканите в устната кухина. Тази тяхна характеристика също така повишава и антагонистичния ефект срещу патогенни микроорганизми в ГИТ (Mgomi et al., 2023).

Методът на оцветяване с кристал виолет се използва като индиректен метод за определяне на количество образуван биофилм (Djordjevic et al., 2002). Всички изследвани щамове МКБ проявяват способност за образуване на биофилм с различаващ се процент (Фигура 7). Най-високият процент на образуване на биофилм при този *in vitro* анализ е установен за щам *L. delbrueckii* subsp. *lactis* VG 2, отчетен над 96 %. При щамовете *L. fermentum* TC 3-11 и N 4-5 също са установени добре изразени проценти на биофилмово образуване, отчетени над 74 %. За щамовете *L. fermentum* NA 2-2, *L. delbrueckii* subsp. *sunkii* VG 1 и *L. delbrueckii* subsp. *lactis* МК 13-1 е отчетена способност за собствено формиране на биофилм над 50 %.

При получените резултати се наблюдават значителни различия между щамовете на едни и същи видове МКБ. Формирането на собствен биофилм за четирите щамове *L. fermentum* варира между 36 % и 83 %. При изследваните щамове *L. delbrueckii*, въпреки че VG 1 и МК 13-1 показват сходно образуване на биофилм, се наблюдава, че резултатът при VG 2 е значително по-висок. Двата щамове *W. confusa* AG 2-6 и NN1 също показват различия в способността за биофилмово образуване. Тези данни предполагат, че формирането на собствен биофилм е щамово специфична характеристика. Това свойство също може да бъде повлияно от факторите на околната среда, както и микробиома в устната кухина.



Фигура 7 – Образуване на биофилм на изследваните щамове МКБ. Представени са средните стойности \pm SD. One-way ANOVA ($p < 0.01$). Щамове: *L. fermentum* N 2, *L. fermentum* N 4-5, *W. confusa* AG 2-6, *L. curvatus* KG 12-1, *L. fermentum* TC 3-11, *L. delbrueckii* subsp. *sunkii* VG 1, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* VG 2, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* МК 13-1, *W. confusa* NN 1, *L. rhamnosus* NA 1-8, *L. fermentum* NA 2-2 и *L. paracasei* AV 2-1.

В изследване на Jha et al., формирането на биофилм също е показало различия в резултатите между 19.32 % и 85.84 % при шест изследвани щамове МКБ (Jha et al., 2022). Gómez et al. са описали подобни резултати на щамова специфичност при формирането на биофилм между изследваните от тях щамове на видовете *L. lactis* и *L. curvatus* (Gómez et al., 2016). Kubota et al. са оценили 46 щамове МКБ, включително осем щамове *L. plantarum* и четири щамове *L. brevis*, като резултатите показали различия във формирането на биофилм сред представителите на един и същи вид (Kubota et al., 2008).

4.4. Биоинформатичен анализ за наличие на белтъци адhezини

Съществуват множество биоинформатични инструменти за генетична обработка, както и аналитични техники за откриване на молекулните механизми, отговорни за разпознаване и адхезия на бактериалните клетки по мукозните повърхности. Такива механизми включват и въглехидрат-белтъчни взаимодействия чрез адhezини, експресирани по повърхността на бактериалните клетки (Van Tassell and Miller, 2011; Juge, 2012; Etzold and Juge, 2014).

Проведени са биоинформатични *in silico* анализи на целите геномни секвенции за наличие на генетични детерминанти за белтъци адhezини, отговорни за установените при *in vitro* анализите адhezивни характеристики на изследваните щамове. При

биоинформатичната обработка са открити гени за два типа адхезивни белтъци: адхезини, подпомагачи адхезията на МКБ към тъкани и други клетки и лектини, които подпомагат свързването на МКБ към въглехидрати и други белтъци (Таблица 6).

Таблица 6 – Детекция на генетични детерминанти за адхезини и лектини от обработката на целите геномни секвенции на изследваните щамове МКБ.

Щам	Адхезини	Лектини
<i>L. fermentum</i> N 2	KxYKxGKxW signal peptide domain-containing protein LPxTG cell wall anchor domain-containing protein MucBP domain-containing protein SEC 10/PgrA surface exclusion domain-containing protein YSIRK-type signal peptide-containing protein	-
<i>L. fermentum</i> N 4-5	KxYKxGKxW signal peptide domain-containing protein LPxTG cell wall anchor domain-containing protein SEC 10/PgrA surface exclusion domain-containing protein YSIRK-type signal peptide-containing protein	-
<i>W. confusa</i> AG 2-6	KxYKxGKxW signal peptide domain-containing protein LPxTG cell wall anchor domain-containing protein MucBP domain-containing protein	WxL domain-containing protein L-type lectin-domain-containing protein
<i>L. curvatus</i> KG 12-1	LPxTG cell wall anchor domain-containing protein MucBP domain-containing protein	WxL domain-containing protein
<i>L. fermentum</i> TC 3-11	KxYKxGKxW signal peptide domain-containing protein LPxTG cell wall anchor domain-containing protein MucBP domain-containing protein SEC 10/PgrA surface exclusion domain-containing protein YSIRK-type signal peptide-containing protein	-
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>sunkii</i> VG 1	LPxTG cell wall anchor domain-containing protein SEC 10/PgrA surface exclusion domain-containing protein YSIRK-type signal peptide-containing protein	-
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> VG 2	LPxTG cell wall anchor domain-containing protein SEC 10/PgrA surface exclusion domain-containing protein YSIRK-type signal peptide-containing protein	-
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> MK 13-1	LPxTG cell wall anchor domain-containing protein SEC 10/PgrA surface exclusion domain-containing protein YSIRK-type signal peptide-containing protein	-
<i>W. confusa</i> NN 1	KxYKxGKxW signal peptide domain-containing protein LPxTG cell wall anchor domain-containing protein MucBP domain-containing protein	WxL domain-containing protein L-type lectin-domain-containing protein
<i>L. rhamnosus</i> NA 1-8	KxYKxGKxW signal peptide domain-containing protein LPxTG cell wall anchor domain-containing protein MucBP domain-containing protein	WxL domain-containing protein
<i>L. fermentum</i> NA 2-2	KxYKxGKxW signal peptide domain-containing protein LPxTG cell wall anchor domain-containing protein MucBP domain-containing protein SEC 10/PgrA surface exclusion domain-containing protein YSIRK-type signal peptide-containing protein	-
<i>L. paracasei</i> AV 2-1	LPxTG cell wall anchor domain-containing protein MucBP domain-containing protein SEC 10/PgrA surface exclusion domain-containing protein	WxL domain-containing protein L-type lectin-domain-containing protein

Установено е, че при всички изследвани щамове МКБ са налични генетични детерминанти за адhezини, съдържащи LPxTG, YSIRK, KxYKxGKxW и SEC 10/PgrA домени, както и MucBP домени, които са част от семейството на муцин-свързващите белтъци. От друга страна, лектини са открити при щамовете *L. curvatus* KG 12-1, *L. rhamnosus* NA 1-8, *L. paracasei* AV 2-1, *W. confusa* AG 2-6 и NN 1 с присъствието на WxL домен от CscC белтъчното семейство и L-тип лектинов домен.

Адhezините експресирани от МКБ се класифицират спрямо таргетното място за свързване върху мукозната тъкан, както и тяхната локализация и/или начина на „закотвяне“ върху клетъчната повърхност (Vélez et al., 2007). Клетъчната повърхност съдържа в структурата си белтъчни молекули, които са свързани към клетъчната стена чрез „закотвящ“ домен в С-края, кодиран от секвенция LPxTG. Съответно в N-края на белтъчната молекула са установени домени, кодирани от различни сигнални секвенции като YSIRK и KxYKxGKxW, които обуславят различните адhezивни способности на клетките на МКБ, както и конкурентоспособността им към различни патогенни представители. SEC 10/PgrA домена определя способността за осъществяване на адhezия, а MucBP домена отговаря основно за свързването на клетките към експресираните по мукозната тъкан муцинови белтъци (Nishiyama et al., 2016; Patel et al., 2017; Albarracin et al., 2022).

При МКБ експресиращи лектини локализация на клетъчната повърхност се обуславя чрез WxL домена, а на взаимодействие с епителните клетки по мукозната тъкан чрез L-тип лектиновия домен (Brinster et al., 2007; Tsuchiya et al., 2023). Детекцията на генетични детерминанти за белтъци адhezини подкрепя установените при *in vitro* анализите агрегационна способност, способности за свързване с муцин и образуване на биофилм при изследваните щамове МКБ. Също така, тези повърхностноклетъчни структури биха имали роля и при коагрегация с патогени и способност за инхибиране на патогенни биофилми, каквито резултати от настоящите изследвания са описани в точка 9.

5. Оценка на антибиотичната резистентност и биоинформатичен анализ за придобити гени за резистентност при изследваните щамове МКБ

Оценката на антибиотичната резистентност е един от основните и изключително важни стандарти, свързани с технологичното приложение и пробиотичния потенциал на МКБ. Оценката на антибиотичната резистентност на МКБ чрез прилагане на фенотипни и генотипни изследвания се базира на определяне на възможният хоризонтален трансфер на гени за антибиотична резистентност към коменсални и патогенни микроорганизми, връзката на видове в някои случаи на заболявания и възможността за комбинирано антибиотично с пробиотично лечение, с цел възстановяване на нормалната микрофлора в ГИТ (Gad et al., 2014).

За анализа за антибиотична резистентност при изследваните щамове са използвани тринадесет вида антибиотични вещества. Използваните антибиотици са подбрани с различни механизми на действие при микроорганизмите: инхибиращи

белтъчния синтез, инхибиращи синтеза на клетъчната стена и инхибиращи синтеза на ДНК (Таблица 7).

Установена е чувствителност на всички изследвани щамове към пет от тестваните антибиотици: ампицилин, клиндамицин, хлорамфеникол, еритромицин и тетрациклин. При двата щамове *W. confusa* AG 2-6 и NN 1 е отчетена резистентност към рифампицин. Изследваните щамове проявяват отчетлива резистентност към три от тестваните антибиотици – канамицин, неомицин и стрептомицин, които са инхибитори на белтъчния синтез. Към гентамицин, единствено *L. fermentum* TC 3-11 проявява междинна чувствителност, докато всички останали щамове са резистентни. Към ципрофлоксацин, който е инхибитор на синтеза на ДНК, за всички щамове освен *L. rhamnosus* NA 1-8 е установена резистентност. Към ванкомицин, който е инхибитор на синтеза на клетъчна стена, трите щамове *L. delbrueckii* проявяват интермедиерна чувствителност, а при останалите изследвани щамове е отчетена резистентност. При повечето от щамовете МКБ е установена резистентност към триметоприм, освен три от щамовете *L. fermentum* N2, TC 3-11 и NA 2-2, които проявяват чувствителност към антибиотика.

В допълнение е изчислен и коефициента на мултирезистентност, който показва стойности между 0.385 и 0.615 при различните изследвани щамове.

Таблица 7 – Антибиотична резистентност на изследваните щамове МКБ. Щамове: *L. fermentum* N 2, *L. fermentum* N 4-5, *W. confusa* AG 2-6, *L. curvatus* KG 12-1, *L. fermentum* TC 3-11, *L. delbrueckii* subsp. *sunkii* VG 1, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* VG 2, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* МК 13-1, *W. confusa* NN 1, *L. rhamnosus* NA 1-8, *L. fermentum* NA 2-2 и *L. paracasei* AV 2-1.

Щам	Антибиотици													МАР индекс
	AMP	CD	VA	CIP	TR	C	E	GEN	K	N	RD	S	TE	
N 2	Ч	Ч	Р	Р	Ч	Ч	Ч	Р	Р	Р	Ч	Р	Ч	0.462
N 4-5	Ч	Ч	Р	Р	Р	Ч	Ч	Р	Р	Р	Ч	Р	И	0.538
AG 2-6	Ч	Ч	Р	Р	Р	Ч	Ч	Р	Р	Р	Р	Р	Ч	0.615
KG 12-1	Ч	Ч	Р	Р	Р	Ч	Ч	Р	Р	Р	Ч	Р	Ч	0.538
TC 3-11	Ч	Ч	Р	Р	Ч	Ч	Ч	И	Р	Р	Ч	Р	Ч	0.385
VG 1	Ч	Ч	И	Р	Р	Ч	Ч	Р	Р	Р	Ч	Р	Ч	0.462
VG 2	Ч	Ч	И	Р	Р	Ч	Ч	Р	Р	Р	Ч	Р	Ч	0.462
МК 13-1	Ч	Ч	И	Р	Р	Ч	Ч	Р	Р	Р	Ч	Р	Ч	0.462
NN 1	Ч	Ч	Р	Р	Р	Ч	Ч	Р	Р	Р	Р	Р	Ч	0.615
NA 1-8	Ч	Ч	Р	И	Р	Ч	Ч	Р	Р	Р	Ч	Р	Ч	0.462
NA 2-2	Ч	Ч	Р	Р	И	Ч	Ч	Р	Р	Р	Ч	Р	Ч	0.462
AV 2-1	Ч	Ч	Р	Р	Р	Ч	Ч	Р	Р	Р	Ч	Р	Ч	0.538

Р – резистентен, И – интермедиерен, Ч – чувствителен (CLSI, 2020); Антибиотици: Ампицилин (AMP) - 10 mcg/disk; Клиндамицин (CD) - 2 mcg/disk; Ванкомицин (VA) - 5 mcg/disk; Ципрофлоксацин (CIP) - 5 mcg/disk; Триметоприм (TR) - 5 mcg/disk; Хлорамфеникол (C) - 30 mcg/disk; Еритромицин (E) - 15 mcg/disk; Гентамицин (GEN) - 10 mcg/disk; Канамицин (K) - 30 mcg/disk; Неомицин (N) - 30 mcg/disk; Рифампицин (RD) - 5 mcg/disk; Стрептомицин (S) - 10 mcg/disk; Тетрациклин (TE) - 30 mcg/disk.

За допълване на изследванията към проведеня анализ за фенотипна антибиотична резистентност на изследваните щамове е извършен и биоинформатичен анализ за установяване на генетични детерминанти за антибиотична резистентност. Обработени са данните от цялостните геномни последователности, като от резултатите от обработката се установява, че изследваните щамове не притежават придобити генетични детерминанти за антибиотична резистентност като *cat*, *erm(B)* и *tet(M)* гени, които са едни от основните проследявани и този резултат позволява да бъдат оценени като безопасни по тази характеристика съгласно изискванията за Квалифицирана презумпция за безопасност (QPS) на EFSA (EFSA, 2018).

Установената антибиотична резистентност на изследваните даванадесет щама може да се определя от различни вътреклетъчни механизми (Anisimova and Yarullina, 2019). Повечето МКБ притежават висока естествена резистентност към гликопептидни антибиотични вещества, какъвто е ванкомицина, като тази тяхна характеристика се обуславя от различия в хромозомното кодиране при пътя за асемблиране на пептидогликан (Zhang et al., 2018b). Също така, МКБ са предимно резистентни към аминогликозидни антибиотици, каквито са канамицина, неомицина, стрептомицина и гентамицина, като тази характеристика е считана за обослужена от два основни фактора: ниска пропускливост на бактериалната клетъчна стена към аминогликозиди и отсъствие на някои елементи на цитохром-медирания електронен транспорт (Dec et al., 2018; Duskoва et al., 2020). Докладвано е още, че МКБ проявяващи естествена резистентност към диаминопиримидинови антибиотици, какъвто е триметоприма, не притежават биосинтетичен път за синтез на фолиева киселина, тъй като действието на антибиотика се обуславя с блокиране на дихидроптероат синтетазната активност в клетките (Ammor et al., 2007; Duche et al., 2023). Резистентността към флуорохинолонови антибиотици, какъвто е ципрофлоксацина, вероятно се дължи на непропускливост на клетъчната стена, както и на мутации в регионите, определящи резистентността към хинолони, които формират генетичната основа за резистентност при МКБ (Li et al., 2015; Zarzecka et al., 2022).

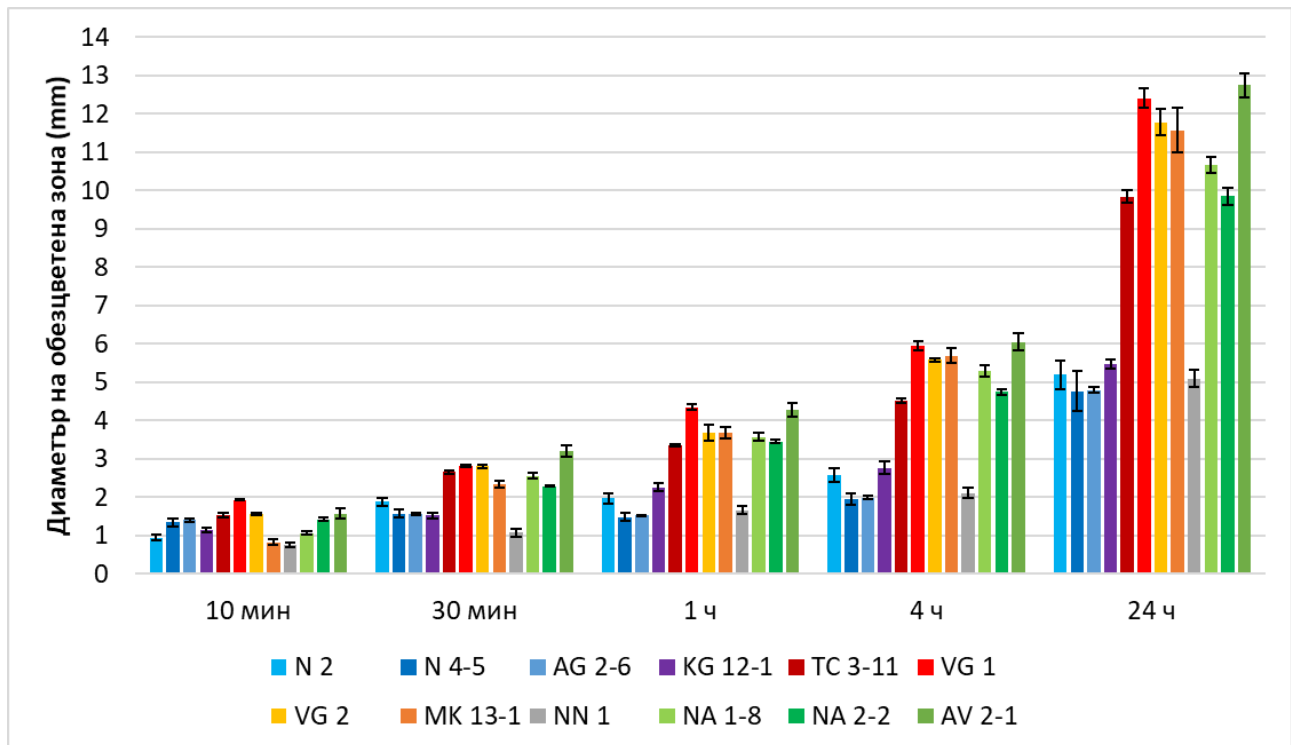
От изследвания на редица автори се смята, че резистентността към определени групи от антибиотици, както и чувствителността към други, зависи от източника на изолатите. Допуска се, че изолатите МКБ с човешки произход проявяват по-широка резистентност, отколкото такива от хранителни източници, поради по-високата вероятност от излагане на антибиотични вещества в естествената им среда (Danielsen and Wind, 2003; Sharma et al., 2017; Duche et al., 2023). Установените резистентности при изследваните щамове се потвърждават и от други автори, като на Delgado et al., 2005; Zhou et al., 2005; Selvin et al., 2020 и Wang et al., 2022, както в други от цитираните по-рано източници.

6. Скрининг за антиоксидантен капацитет на изследваните щамове МКБ

Важно и не толкова широко проучвано свойство при МКБ е тяхната антиоксидантна активност. От съществено значение е да бъдат оценени антиоксидантната активност

и капацитет на МКБ, тъй като синтезата на антиоксидантни ензими може да предпази гостоприемника от ефектите на свободните радикали, участващи в развитието на много хронични заболявания (Zehiroglu and Ozturk Sarikaya, 2019). Използваната методика за това изследване е адаптирана за МКБ, която се оценява тоталният антиоксидантен капацитет на нативни безклетъчни супернатанти (Hanchi et al., 2022).

Получените резултати показват, че супернатантите от всички изследвани щамове притежават антиоксидантен капацитет поради реакцията на органичните антиоксидантни вещества с $KMnO_4$ и образуването на обезцветени зони. На 10 мин. от началото на експеримента вече се наблюдават малки обезцветени зони, като след 30 мин., 1 ч. и 4 ч. зоните са с отчетливи граници (Фигура 8).



Фигура 8 – Тотален антиоксидантен капацитет на изследваните щамове МКБ. Представени са средните стойности \pm SD. Щамове: *L. fermentum* N 2, *L. fermentum* N 4-5, *W. confusa* AG 2-6, *L. curvatus* KG 12-1, *L. fermentum* TC 3-11, *L. delbrueckii* subsp. *sunkii* VG 1, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* VG 2, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* MK 13-1, *W. confusa* NN 1, *L. rhamnosus* NA 1-8, *L. fermentum* NA 2-2 и *L. paracasei* AV 2-1.

Добре изразен антиоксидантен капацитет се наблюдава при безклетъчните супернатанти на щамове *L. fermentum* TC 3-11 (pH 3.72) и NA 2-2 (pH 3.92), *L. delbrueckii* subsp. *sunkii* VG 1 (pH 3.42), *L. delbrueckii* subsp. *lactis* VG 2 (pH 3.41) и MK 13-1 (pH 3.54), *L. rhamnosus* NA 1-8 (pH 3.60) и *L. paracasei* AV 2-1 (pH 3.44).

На 24 ч. образуваните зони са вече с дифузни граници. Щамове *L. delbrueckii* subsp. *sunkii* VG 1 и *L. paracasei* AV 2-1 проявяват най-висок антиоксидантен капацитет сред изследваните МКБ. Безклетъчните супернатанти от щамове *L. fermentum* N 2 (pH 3.99) и N 4-5 (pH 4.00), *W. confusa* AG 2-6 (pH 3.89) и NN 1 (pH 3.92) и *L. curvatus* KG 12-1 (pH 3.90) проявяват по-ниски антиоксидантни свойства в условията на

експеримента. Може да се отбележи, че между 30 мин. и 4 ч. се наблюдава относително равномерно увеличаване на диаметъра на обезцветените зони.

Hanchi et al. са оценили, че адаптирания агаров KMnO_4 метод за определяне на тотален антиоксидантен капацитет е линеен, прецизен и повторяем във времеви диапазон от 30 мин. до 4 ч. и е подходящ за анализиране на безклетъчни супернатанти от МКБ (Hanchi et al., 2022). Проведеният анализ е предварителен скрининг и дава информация за тотален антиоксидантен капацитет, като за комплексно изследване на способността на щамове МКБ за понижаване на оксидативен стрес могат да се приложат и други методи, като DPPH, ABTS или реакция на Фентън,.

7. Антагонистична активност на изследваните щамове МКБ с микробни тест-патогени, включително орални тест-патогени

7.1. Скрининг за антимикуробна активност срещу тест-патогени и биоинформатичен анализ за наличие на гени за продукция на бактериоцини

Пробиотичните щамове с приложение за поддържане здравето на устната кухина могат успешно да се конкурират с патогенни микроорганизми и да поддържат развитието на коменсалните бактерии, за да могат да допринесат положително основно за превенцията на орални заболявания, както и при тяхната терапия (Тексе et al., 2015; Nadkerny et al., 2015; Sabatini et al., 2017; Keller et al., 2018; Grusovin et al., 2020). Значителен брой бактериални и дрождеви представители могат, при подходящи условия, да изменят коменсалните си характеристики и да започнат да проявяват патогенни ефекти, колонизирайки в човешкото тяло, включително устната кухина (Parahitiyawa et al., 2010; Han, 2015; Proença et al., 2017). Патогенните микроорганизми могат да преживяват при неблагоприятни за тях условия, както и да се разпространяват сравнително лесно. Поради това, е от изключително значение да се изследва възможността на МКБ да инхибират тяхното развитие.

Използван е комплексен подход за установяване на антагонистичните взаимодействия на изследваните щамове, включващ антимикуробна активност на безклетъчни супернатанти срещу широк спектър от Грам-положителни и Грам-отрицателни тест-патогени, антагонистична активност срещу два орални тест-патогена, както и адхезивни взаимодействия с тях.

Проведено е изследване за оценка на антимикуробната активност на изследваните щамове срещу два селектирани вида орални патогена *S. mutans* и *C. albicans*, както и срещу гастроинтестинални и кожни видове патогени *B. subtilis*, *B. cereus*, *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Ps. aeruginosa* и *P. acnes* чрез метода на дифузия в агар. Получените резултати показват наличие на антимикуробна активност при нативните безклетъчни супернатанти (Таблица 8).

Таблица 8 – Антимикробна активност на изследваните щамове МКБ (нативни безклетъчни супернатанти) срещу тест-патогени. Щамове: *L. fermentum* N 2, *L. fermentum* N 4-5, *W. confusa* AG 2-6, *L. curvatus* KG 12-1, *L. fermentum* TC 3-11, *L. delbrueckii* subsp. *sunkii* VG 1, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* VG 2, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* МК 13-1, *W. confusa* NN 1, *L. rhamnosus* NA 1-8, *L. fermentum* NA 2-2 и *L. paracasei* AV 2-1.

Щам	рН на нативна супернатанта	Диаметър на зона (мм)								
		<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. acnes</i>	<i>S. mutans</i>	<i>C. albicans</i>
N 2	3.99	13.0 ± 0.5	12.0 ± 0.3	12.0 ± 0.5	H3	H3	H3	H3	H3	H3
N 4-5	4.00	13.5 ± 0.5	11.0 ± 0.2	11.0 ± 0.3	H3	H3	H3	H3	H3	H3
AG 2-6	3.89	12.0 ± 0.2	H3	H3	H3	13.0 ± 0.1	H3	12.0 ± 0.2	12.0 ± 0.3	H3
KG 12-1	3.90	H3	H3	H3	H3	H3	H3	H3	H3	H3
TC 3-11	3.72	13.0 ± 0.5	11.0 ± 0.3	12.0 ± 1.0	H3	H3	11.0 ± 0.1	H3	H3	H3
VG 1	3.42	17.0 ± 0.5	14.6 ± 0.6	14.6 ± 0.6	13.5 ± 0.5	H3	11.0 ± 0.2	H3	H3	H3
VG 2	3.41	17.6 ± 0.4	15.3 ± 0.2	14.0 ± 0.1	13.0 ± 0.1	H3	11.0 ± 0.2	H3	H3	H3
МК 13-1	3.54	17,0 ± 0,5	15.5 ± 0.5	14.6 ± 0.4	12.0 ± 0.1	H3	11.0 ± 0.2	H3	H3	H3
NN 1	3.92	13.0 ± 0.2	H3	H3	H3	12.0 ± 0.1	H3	12.0 ± 0.1	13.0 ± 0.2	H3
NA 1-8	3.60	14.0 ± 0.1	13.2 ± 0.3	H3	H3	H3	H3	H3	H3	H3
NA 2-2	3.92	13.0 ± 0.3	12.5 ± 0.5	H3	H3	H3	12.0 ± 1.0	H3	H3	H3
AV 2-1	3.44	13.0 ± 0.1	H3	12.0 ± 0.1	H3	H3	H3	H3	H3	H3

H3 – няма отчетена зона; представени са средните стойности ± SD.

Срещу *E. coli* се наблюдава инхибиторни зони при всички щамове, освен *L. curvatus* KG 12-1, а срещу срещу *B. subtilis* и *B. cereus* при повечето от щамовете. При щамовете *L. fermentum* TC 3-11, *L. delbrueckii* subsp. *sunkii* VG 1, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* VG 2 и МК 13-1 и *L. fermentum* NA 2-2 е отчетена активност срещу *Ps. aeruginosa*. Инхибиторни зони при *S. aureus* са отчетени от три от изследваните щамове *L. delbrueckii* subsp. *sunkii* VG 1, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* VG 2 и МК 13-1. Срещу *S. epidermidis*, *P. acnes* и *S. mutans* активност проявяват само двата щамове *W. confusa* AG 2-6 и NN 1. Не е отчетена антимикробна активност при провеждане на анализите с нативните супернатанти срещу оралния патоген *C. albicans*. Установените антимикробни активности при прилагане на нативните безклетъчни супернатанти се обуславят основно от синтезираните нискомолекулни органични киселини при условията на култивиране на щамовете.

При прилагане на неутрализираните безклетъчни супернатанти на всички изследвани щамове не е установена антимикробна активност срещу всички включени в експеримента тест-патогени като е важно да се отбележи, че безклетъчните супернатанти са получени при оптимални условия на култивиране на щамовете, без наличие на фактори, индуциращи синтеза на специфични метаболити и след тяхната неутрализация е елиминиран антимикробния ефект на нискомолекулните киселинни продукти.

Получените резултати от антимикробната активност показват специфичност на изследваните щамове МКБ към различните тест-патогени, но единствено от нативните безклетъчни супернатанти. Продуцирането на органични киселини е един от най-важните механизми обуславящи антимикробните свойства на МКБ, чрез които те конкурентно проявяват антагонистични взаимодействия срещу редица патогенни видове (Gao et al., 2019). В изследване на Ren et al., включващо щамове *Lactiplantibacillus pentosus*, *L. plantarum* и *L. paracasei*, е установена антимикробна активност срещу *E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus* и *S. enterica* (Ren et al., 2018). В друго изследване, Matevosyan et al. са оценили антимикробните характеристики на щамове МКБ, включително *L. rhamnosus*, като е установено инхибиране на патогените *E. coli*, *Ps. aeruginosa*, *S. aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus mesentericus* и *M. luteus* (Matevosyan et al., 2019). Широко описана е антимикробната активност срещу *S. mutans* (Vuotto et al., 2014). Според изследване на Sookkhee et al., оценени от тях щамове *L. paracasei* subsp. *paracasei* и *L. rhamnosus* проявяват добре изразени антимикробни характеристики срещу някои от значимите орални патогени *S. mutans*, *S. sanguinis* и *P. gingivalis* (Sookkhee et al., 2001). Щамове *L. salivarius*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* и *L. fermentum*, изследвани от Strahinic et al., са проявили антимикробна активност срещу *S. mutans* и *Streptococcus pneumoniae* (Strahinic et al., 2007).

Антимикробни ефекти към опортюнистични патогени като *C. albicans* са рядко наблюдавани и научни изследвания показват, че инхибиторна способност от МКБ срещу представители на род *Candida* не е видово специфична характеристика, а зависи от техния произход на изолиране (Itapary dos Santos et al., 2019). Някои научни трудове описват инхибиторна активност на МКБ изолирани от човека, докато други

проучвания докладват, че много изследвани МКБ не проявяват антимикробна активност срещу *Candida* (Denkova et al., 2013; Ariningsih et al., 2017; Itapary dos Santos et al., 2019; Liao et al., 2019). Много изследователи продължават изследванията върху активността на нови изолати МКБ, както и изолирани от тях метаболитни продукти с потенциален инхибиторен ефект срещу *C. albicans*, поради това че патогена причинява заболявания не само в устната кухина, но и в други органи на човешкото тяло.

Въз основа на хипотезата, че други вещества с антимикробна активност, като бактериоцини, могат да бъдат синтезирани при наличие на съответната генетична информация и индуциране на синтеза, е проведен *in silico* анализ на целогеномните секвенции, които показват наличие на механизми за продукция на бактериоцини при някои от изследваните щамове (Таблица 9).

Таблица 9 – Открити механизми за продукция на бактериоцини при изследваните щамове.

Бактериоцини	Щамове
Blp family class II bacteriocin	<i>L. curvatus</i> KG 12-1; <i>L. paracasei</i> AV 2-1
leucocin A/sakacin P family class II bacteriocin	<i>L. curvatus</i> KG 12-1
class IIb bacteriocin, lactobin A/cerein 7B family	<i>L. rhamnosus</i> NA 1-8
helveticin J family class III bacteriocin	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>sunkii</i> VG 1; <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> VG 2; <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> МК 13-1

Получените данни са предпоставка за последващи по-задълбочени проучвания на антагонистичните активности на изследваните щамове МКБ. Изследването на антагонистичната активност е един от основните фактори за оценяване на директните взаимодействия на потенциално пробиотични МКБ с различни патогени. Поради широкото им разпространение в околната среда и включването им в състава на много хранителни продукти, МКБ проявяват разнообразен спектър от инхибиращи активности, както и възможност за биоконтрол на различни заболявания. Антагонистичните взаимодействия включват продукция на антимикробни метаболити, каквито са органичните киселини, бактериоцините и пр., както и директни взаимодействия като способност за адхезия и инхибиране на патогенната адхезия към мукозната тъкан; агрегационни способности, включително коагрегация; (Choi et al., 2018; Leska et al., 2022).

7.2. Антагонистична активност на изследваните щамове срещу орални тест-патогени в условия на ко-култивиране

Необходимо е изследване на директните взаимодействия на МКБ с орални патогени, за да може да се оцени тяхната конкурентоспособност в околната среда на устната кухина. За оценка на пряката антагонистична активност са използвани качествен и количествен метод. При проведения спот анализ са отчетени зони на

инхибиране от всички изследвани щамове срещу оралния тест-патоген *S. mutans*. Срещу *C. albicans* са отчетени инхибиторни зони при осем от щамовете: *L. fermentum* N2, N 4-5, TC 3-11 и NA 2-2, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* VG 2, *W. confusa* NN 1, *L. rhamnosus* 1-8 и *L. paracasei* AV 2-1 (Таблица 10).

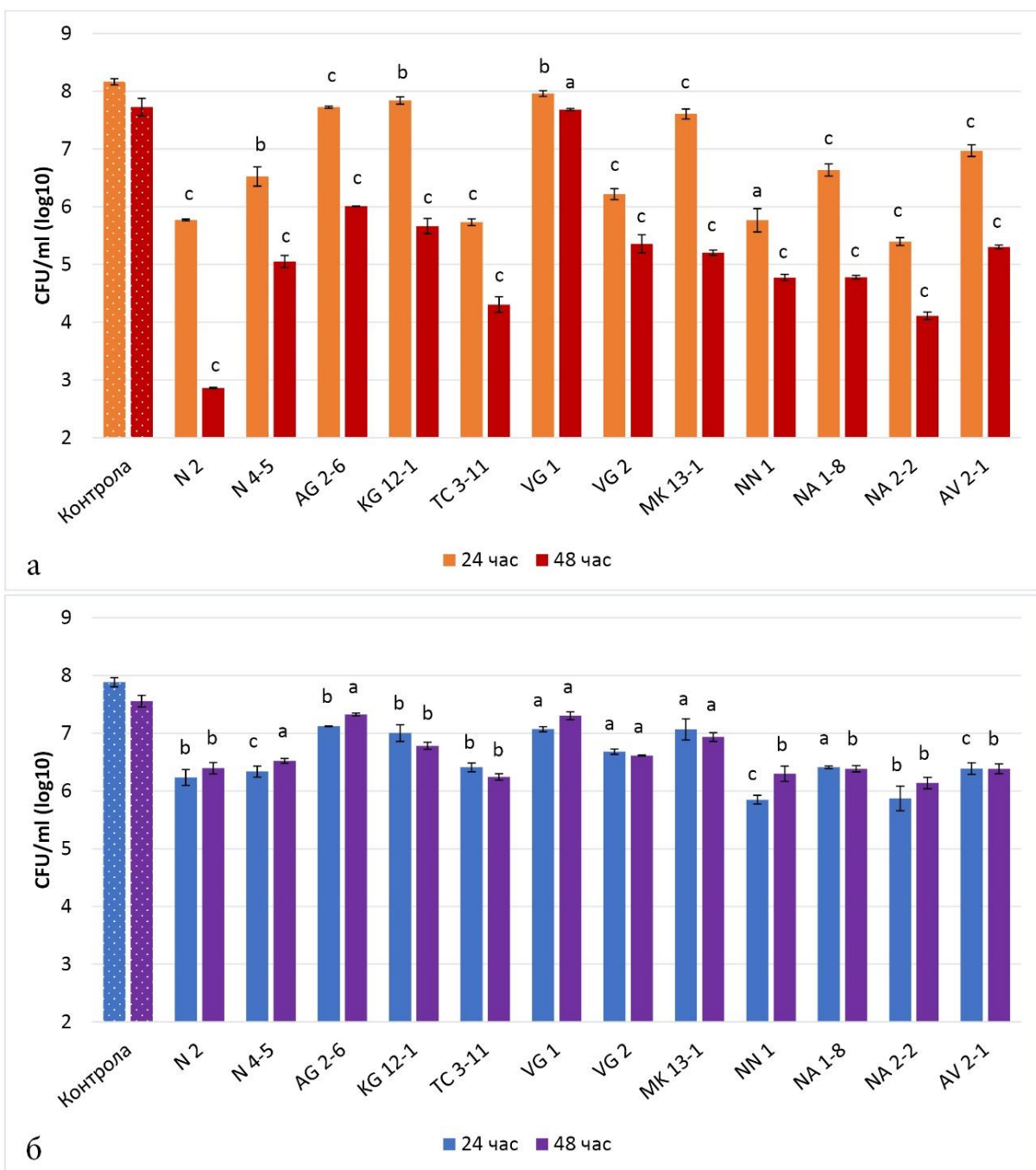
Таблица 10 – Инхибиторна активност на изследваните щамове МКБ срещу *S. mutans* и *C. albicans*.

Щам	<i>S. mutans</i>	<i>C. albicans</i>
<i>L. fermentum</i> N 2	+	+
<i>L. fermentum</i> N 4-5	+	+
<i>W. confusa</i> AG 2-6	+	-
<i>L. curvatus</i> KG 12-1	+	-
<i>L. fermentum</i> TC 3-11	+	+
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>sunkii</i> VG 1	+	-
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> VG 2	+	+
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> МК 13-1	+	-
<i>W. confusa</i> NN 1	+	+
<i>L. rhamnosus</i> NA 1-8	+	+
<i>L. fermentum</i> NA 2-2	+	+
<i>L. paracasei</i> AV 2-1	+	+

Получените резултати служат като първичен скрининг на антагонистичните активности на изследваните щамове към селектираните орални тест патогени. Последващият анализ за директно ко-култивиране е проведен с цел количествено установяване на антагонистичната активност на изследваните щамове срещу двата орални патогена (Фигура 9).

Резултатите от директното ко-култивиране показват, че към 24^{ти} час на процеса щамовете *L. fermentum* N2, N 4-5, TC 3-11 и NA 2-2, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* VG 2, *W. confusa* NN 1, *L. rhamnosus* NA 1-8 и *L. paracasei* AV 2-1 проявяват отчетлива антагонистична активност срещу *S. mutans* като понижават CFU/mL на патогена с 1 до 3 логаритмични порядъка. На 48^{ри} час е отчетена изразена антагонистична активност при повече от изследваните щамове – *L. fermentum* N 2, N 4-5, TC 3-11 и NA 2-2, *L. curvatus* KG 12-1, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* VG 2 и МК 13-1, *W. confusa* AG 2-6 и NN 1, *L. rhamnosus* 1-8 и *L. paracasei* AV 2-1, като се наблюдава намаляване на CFU/mL на патогена с 2 до 5 порядъка (Фигура 9а).

Относно дрождевия тест-патоген *C. albicans* също са отчетени ефекти, като всички изследвани щамове показват по-слабо изразена антагонистична активност, като е установено понижаване на CFU/mL на патогена с 1 до 2 порядъка до 48^{ри} час (Фигура 9б).



Фигура 9 – Антагонистична активност на изследваните щамове МКБ при директно ко-култивиране с *S. mutans* (а) и *C. albicans* (б). Представени са средните стойности \pm SD. Two-tailed Student's t-test: a – $p > 0.05$; b и c – $p < 0.05$ и $p < 0.01$, съответно. Щамове: *L. fermentum* N 2, *L. fermentum* N 4-5, *W. confusa* AG 2-6, *L. curvatus* KG 12-1, *L. fermentum* TC 3-11, *L. delbrueckii* subsp. *sunkii* VG 1, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* VG 2, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* MK 13-1, *W. confusa* NN 1, *L. rhamnosus* NA 1-8, *L. fermentum* NA 2-2 и *L. paracasei* AV 2-1.

Както *S. mutans*, така и *C. albicans* значително допринасят за патогенезата на кариогенни, кандидозни и пародонтални заболявания (Chevalier et al., 2018; Morrison et al., 2023). МКБ също играят важна роля в оралната екосистема като положително допринасят за оралното здраве (Badet and Thebaud, 2008). Получените данни от

анализите за ко-култивиране показват значително инхибиране на *S. mutans* от повечето от изследваните щамове. При всички тествани щамове се отчита статистически значимо намаление на клетъчната плътност на патогена, но най-изразени ефекти са наблюдавани при щамове *L. fermentum* N 2, TC 3-11 и NA 2-2 и *W. confusa* NN 1 по време на ко-култивирането.

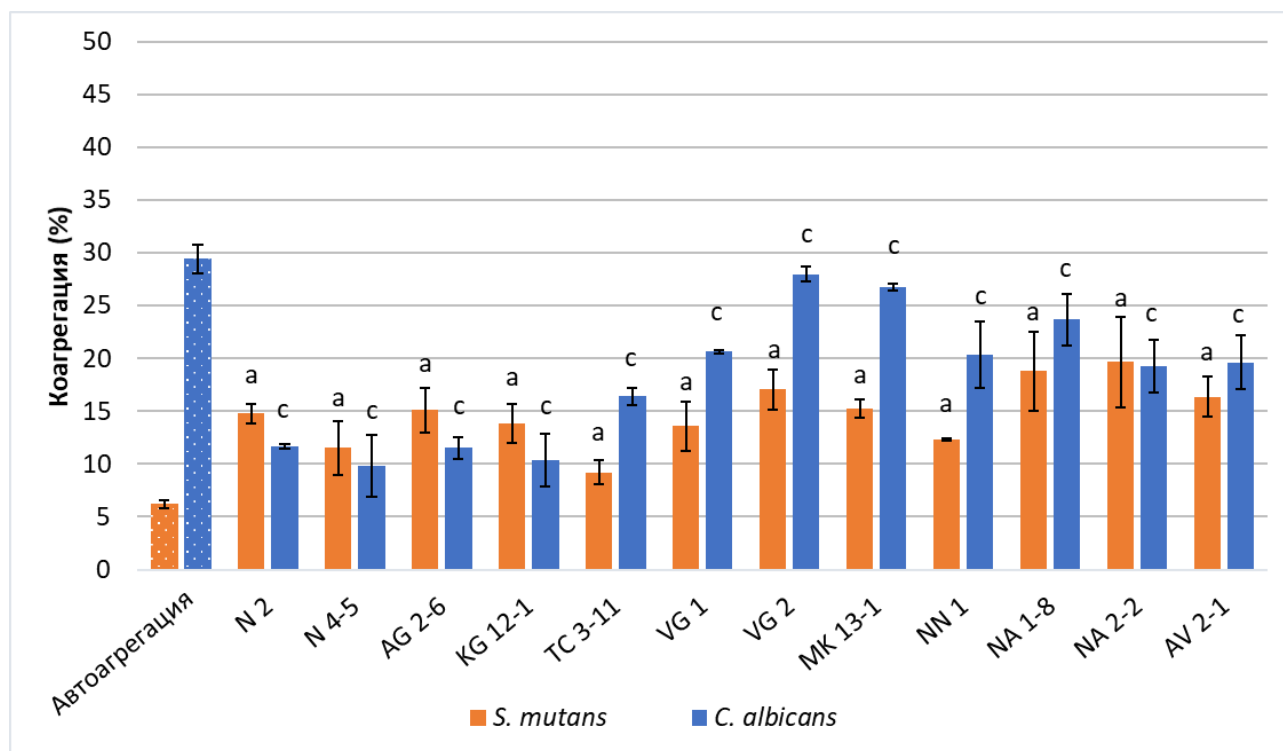
По отношение на *C. albicans* се отчитат ефекти на инхибиране при осем от изследваните щамове при спот анализа, както и по-добре изразена активност със статистически значими разлики при директното ко-култивиране. От друга страна, дрождевия патоген доказва своя опортюнистичен статут (Lopes and Lionakis, 2022) като два от изследваните щамове, *L. fermentum* NA 2-2 и *W. confusa* NN 1, показват инхибиране до два логаритмични порядъка на 24 час от ко-култивирането, но към 48^{-и} часа се наблюдава частично възстановяване в развитието на патогена.

При анализите за ко-култивиране, проведен от Denkova et al., авторите са оценили активността на щам *L. acidophilus* срещу *E. coli*, *Staphylococcus* и *Salmonella* sp., като щамата е понижил клетъчната плътност на изследваните патогени с 1–2 порядъка до 24 час и с 4–8 порядъка до 48 час от ко-култивирането (Denkova et al., 2022). В изследване на Chen et al., щамове *L. fermentum* и *L. salivarius* са проявили добре изразени инхибиторни свойства срещу кариогенни и пародонтални патогени, включително *S. mutans*, *S. sanguinis* и *P. gingivalis* (Chen et al., 2012). В друго изследване, Mann et al. са оценили щам *Lactobacillus gasseri*, който е понижил клетъчната плътност на орални стрептококи, *Porphyromonas* sp. и *F. nucleatum* до 10⁵ CFU/mL (Mann et al., 2021b). В друго свое изследване Denkova et al. са оценили антагонистичната активност на *L. acidophilus* and *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, като щамове са понижили клетъчната плътност на *C. albicans* с два порядъка на 24 час и с 2–3 порядъка на 48 час от ко-култивиране (Denkova et al., 2013). Изследване на Vazquez-Munoz et al. е оценило щам *Lactobacillus johnsonii*, който проявил инхибиторна активност срещу *C. albicans* с 10.1 % при съотношение 1:1 на ко-култивиране за 24 часа (Vazquez-Munoz et al., 2022).

Важно е да се подчертае, че единадесет от изследваните щамове проявяват добре изразена антагонистична активност срещу *S. mutans*, като се отчита статистически значимо понижаване на клетъчната плътност на патогена. Получените резултати от проведеното ко-култивиране подкрепят и значително допълват резултатите, получени от цитираните автори. Малко са научните публикации, оценяващи МКБ при директни ко-култивационни анализи с кариогенни и пародонтални патогени. Докато проучванията, включващи *C. albicans* са по-обширно застъпени, поради природата на патогена и широкото му разпространение и асоциация със заболявания при човека (Lopes and Lionakis, 2022). След направеното литературно проучване се установява, че щамове от видовете *L. curvatus*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei* и *W. confusa* досега не са изследвани чрез методи за директен антагонизъм с орални патогенни микроорганизми. Проведеното изследване обогатява научните данни с потвърждение ефектите при директните взаимодействия на изследваните щамове МКБ с орално-асоциирани патогенни микроорганизми, особено с *S. mutans*, по отношение на техните антагонистични свойства.

7.3. Коагрегациона способност с орални тест-патогени

Коагрегацията представлява междуклетъчни адхезивни взаимодействия между различни микроорганизми (Khemaleelakul et al., 2006). Този вид взаимодействия също се разглеждат като един от възможните механизми за елиминиране на патогените чрез ограничаване на потенциала им за свързване с епителните клетки. При всички анализирани за коагрегационен потенциал изследвани щамове е отчетена тази характеристика при селектираните орални патогени (Фигура 10).



Фигура 10 – Коагрегация на изследваните щамове МКБ с *S. mutans* и *C. albicans*. Представени са средните стойности \pm SD. One-way ANOVA: a – $p > 0.05$; c – $p < 0.01$. Щамове: *L. fermentum* N 2, *L. fermentum* N 4-5, *W. confusa* AG 2-6, *L. curvatus* KG 12-1, *L. fermentum* TC 3-11, *L. delbrueckii* subsp. *sunkii* VG 1, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* VG 2, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* МК 13-1, *W. confusa* NN 1, *L. rhamnosus* NA 1-8, *L. fermentum* NA 2-2 и *L. paracasei* AV 2-1.

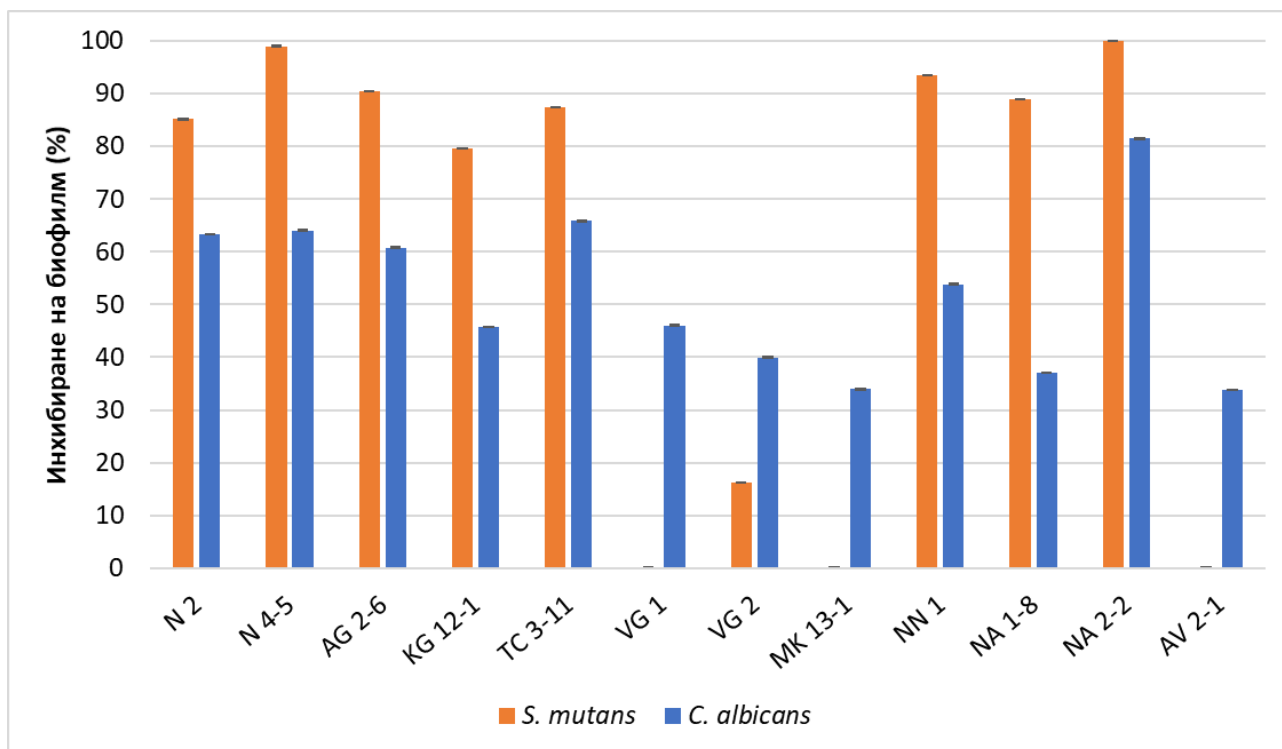
С тест-патогена *S. mutans*, всички изследвани щамове проявяват коагрегационна активност в диапазона 9.22–19.67 %, която е по-висока от собствената автоагрегационна способност на патогена (6.21 %). Най-добре изразена коагрегация с бактериалния патоген се наблюдава при щамовете *L. fermentum* NA 2-2 и *L. rhamnosus* NA 1-8, отчетена съответно 19.67 % и 18.78 %. Относно *C. albicans* при всички изследвани щамове се наблюдава коагрегация в диапазона 9.83–27.97 %, която обаче е по-ниска от автоагрегацията на патогена (29.41 %). *L. delbrueckii* subsp. *lactis* VG 2 и МК 13-1 проявяват най-добре изразена коагрегация с дрождевия патоген, отчетена съответно 27.97 % и 26.76 %. Определянето на потенциалните коагрегационни характеристики на МКБ се влияе от вътрешни фактори и фактори на околната среда (Goh and Klaenhammer, 2010). Докладвани са наблюдения на коагрегация между

микробните видове в състава на оралния микробиом. Предполага се, че МКБ, които проявяват коагрегационни свойства с орални патогени, могат да упражняват важни защитни механизми на гостоприемника срещу поява и развитие на инфекциозни заболявания (Rickard et al., 2003). Получените данни показват, че всички изследвани щамове МКБ притежават свойството да коагрегират със *S. mutans* и повечето проявяват добре изразена коагрегация с *C. albicans*. Не се наблюдава статистически значима разлика в резултатите за коагрегационен потенциал при *S. mutans* между отделните щамове, докато при *C. albicans* е отчетена статистически значима разлика. Това показва специфичност в коагрегационните свойства на изследваните МКБ с дрождевия патоген и може да се третира като щамово-специфично свойство. Наблюдава се, че три от изследваните щамове притежават добре изразена коагрегация с *C. albicans*: *L. delbrueckii* subsp. *lactis* VG 2 и МК 13-1 и *L. rhamnosus* NA 1-8. Щамова специфичност е докладвана също и от други автори. Щамове МКБ, изследвани от Ciandrini et al., включително *L. paracasei* и *L. rhamnosus*, са показали коагрегационни свойства с *S. mutans* в диапазона 6.32–20.93 % (Ciandrini et al., 2017). В изследване на Lai et al., авторите са оценили пет щамове МКБ като отчетели коагрегация с *S. mutans* между 15.93 % и 62.25 % (Lai et al., 2021). В изследване на Aarti et al., е бил оценен щам *L. pentosus*, който проявил коагрегационни свойства, с *C. albicans*, отчетени с 37.1 % (Aarti et al., 2018). Malfa et al. са използвали мултищамова формулировка от МКБ в своето изследване, с включен щам *L. rhamnosus*, и са установили високи коагрегационни свойства с *C. albicans* (Malfa et al., 2023).

7.4. *In vitro* оценка за антибиофилмова активност срещу орални тест-патогени

Способността на МКБ да инхибират образуването на биофилми от патогени в устната кухина е от съществено значение за оралното им пробиотично приложение. При проведеният анализ за антибиофилмова активност, девет от изследваните щамове проявяват инхибиране на формирането на биофилм от *S. mutans* и всички щамове проявяват инхибиторни действия срещу образуване на биофилм от *C. albicans* (Фигура 11). Срещу *S. mutans* осем от щамове проявяват изявена биофилм-инхибираща активност, докато само за три от щамове не е отчетена инхибираща активност в условията на *in vitro* анализа. При щам *L. fermentum* NA 2-2 отчетливо се установява почти 100 % инхибиране на биофилма на *S. mutans*, последван от щамове *L. fermentum* N 2, N 4-5 и TC 3-11, *W. confusa* AG 2-6 и NN 1, *L. curvatus* KG 12-1 и *L. rhamnosus* NA 1-8, които също експресират високи антибиофилмови активности, отчетени над 79 %. При щамове *L. delbrueckii* subsp. *sunkii* VG 1, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* МК 13-1 и *L. paracasei* AV 2-1 не е отчетена антибиофилмова активност при конкретните експериментални условия с тест патогена *S. mutans*. Срещу *C. albicans*, всички изследвани щамове притежават антибиофилмова активност. При щамът *L. fermentum* NA 2-2 е установена най-висока способност за инхибиране на биофилм от дрождевия патоген, отчетено над 81 %, последван от щамове *L.*

fermentum N 2, N 4-5 и TC 3-11 и *W. confusa* AG 2-6, проявяващи антибиофилмова активност над 60 %.



Фигура 11 – Инхибиране формирането на биофилм на *S. mutans* и *C. albicans* от изследваните щамове МКБ. Представени са средните стойности \pm SD. One-way ANOVA ($p < 0.01$). Щамове: *L. fermentum* N 2, *L. fermentum* N 4-5, *W. confusa* AG 2-6, *L. curvatus* KG 12-1, *L. fermentum* TC 3-11, *L. delbrueckii* subsp. *sunkii* VG 1, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* VG 2, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* МК 13-1, *W. confusa* NN 1, *L. rhamnosus* NA 1-8, *L. fermentum* NA 2-2 и *L. paracasei* AV 2-1.

S. mutans продуцира „закотвящи“ белтъци върху клетъчната си стена, които улесняват свързването с *C. albicans*, като по този начин дрождевия патоген подпомага последващата колонизация на стрептококите и по-нататъшното развитие на кариес от образувания биофилм (Bamford et al., 2009; Matsuda et al., 2018; Morrison et al., 2023). Спрямо резултатите от антибиофилмовата активност, щамът *L. fermentum* NA 2-2 проявява най-добре изразено инхибиране на биофилм и на двата орални тест-патогена, като притежава възможността да предотвратява формирането на патогенни биофилми *in vitro*. От резултатите може да се предположи, че проявената антибиофилмова активност срещу избраните орални тест-патогени вероятно е видово зависима характеристика, тъй като са отчетени високи проценти на биофилмово инхибиране и на двата патогена от страна на четирите изследвани щамове *L. fermentum*. *W. confusa* AG 2-6 и NN 1 също показват сходни проценти на инхибиране формирането на биофилм при двата патогена. Сходство е забелязано при антибиофилмовата активност срещу *C. albicans* от страна на трите изследвани *L. delbrueckii* щамове.

В изследване на Patel et al. авторите са оценили антибиофилмовата активност на гликолипиден биосърфактант, синтезиран от новоизолиран щам *L. rhamnosus*, като

резултатите са показали ефективно инхибиране на биофилми от *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* и *S. aureus* (Patel et al., 2021). Шест изследвани от Jha et al. щамове МКБ са показали инхибиращи свойства срещу биофилми от *S. mutans* в диапазона 2.09–15.07 % (Jha et al., 2022). Wasfi et al. са оценили четири щамове, представители на *Lactobacillus* sp., които са показали антибиофилмова активност срещу *S. mutans* между 24.7 и 47 % (Wasfi et al., 2018).

Изолирането на щамове на МКБ от микробиома на гостоприемниците с голяма вероятност определя техния по-изразен потенциал за антагонистична активност срещу различни патогени, което може да се свърже с продължителните периоди на адаптиране както към съответната среда, така и към външни фактори. Спрямо това видове МКБ нормално откриващи се в състава на оралната микробиота могат да притежават по-ефективна антибиофилмова активност, което се потвърждава и от резултатите от изследването за антибиофилмова активност в настоящия дисертационен труд. В изследване на Wu et al. са били оценени голяма група от щамове *L. salivarius*, изолирани от слюнчени проби, инхибиращи образуването на биофилм от *S. mutans* до 69 % (Wu et al., 2015). Изследване на Krzyściak et al. е показало, че щам *L. salivarius* понижил натрупването на биомаса при моно-видови биофилми от *S. mutans* и *C. albicans*, както и мулти-видови биофилми (Krzyściak et al., 2017). Rossoni et al. са оценили щамове *L. fermentum* 20.4, *L. paracasei* 28.4 и *L. rhamnosus* 5.2, които редуцирали образуването на биофилм от *C. albicans* ATCC 18804 и други клинични изолати на дрождевия патоген (Rossoni et al., 2018). При изследване на James et al., авторите са оценили мултищамови МКБ комбинации, които са проявили висока ефективност срещу биофилми на *C. albicans* (James et al., 2016). Получените резултати от проведената антибиофилмова активност на изследваните щамове МКБ показва, че осем от щамове притежават по-високи антибиофилмови свойства срещу *S. mutans* спрямо щамове, оценени от цитираните по-горе автори. Също така, антибиофилмовата активност срещу *C. albicans* е значима, което предполага ефективно влияние от страна на изследваните щамове върху образуването на биофилм от дрождевия патоген.

7.5. Корелационен анализ

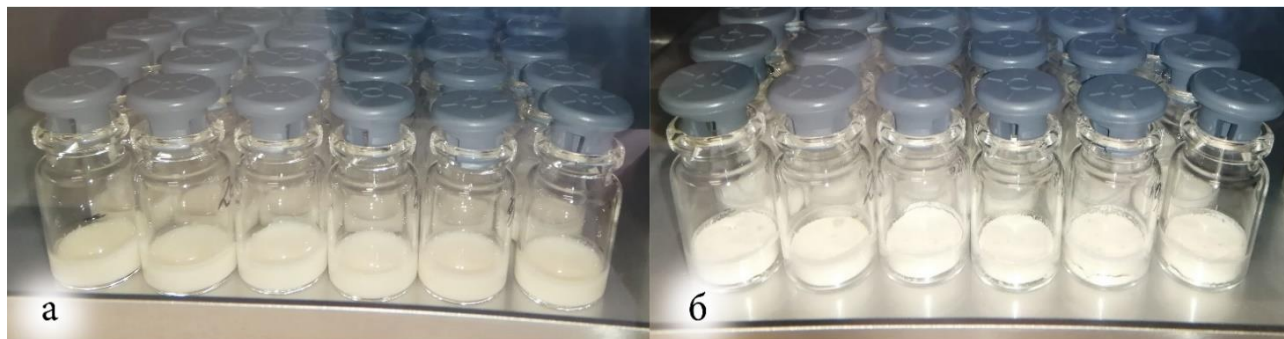
За оценка на взаимовръзката между установените при щамове антагонистични свойства при ко-култивиране, коагрегация и антибиофилмова активност получените резултати са обработени чрез Pearson's correlation анализ. Получените данни показват положителна корелация между директната антагонистичната активност и антибиофилмовата активност на изследваните щамове срещу двата тест-патогена. Положителна корелация е отчетена също между коагрегационната способност и антибиофилмовата активност на щамове МКБ срещу *C. albicans*. Не е отчетена положителна корелация между коагрегацията и антибиофилмовата активност на щамове срещу *S. mutans*. Въз основа на установените корелационни отношения, може да се предположи, че основните механизми за антагонистична активност на изследваните щамове срещу *S. mutans* са свързани главно с тяхната метаболитна

активност. Докато установената антагонистична активност срещу *C. albicans* е вероятно да се определя от преките физически взаимодействия на щамове МКБ с опортюнистичния дрождев патоген.

8. Преживяемост на изследваните щамове МКБ при процес на лиофилизация и съхранение

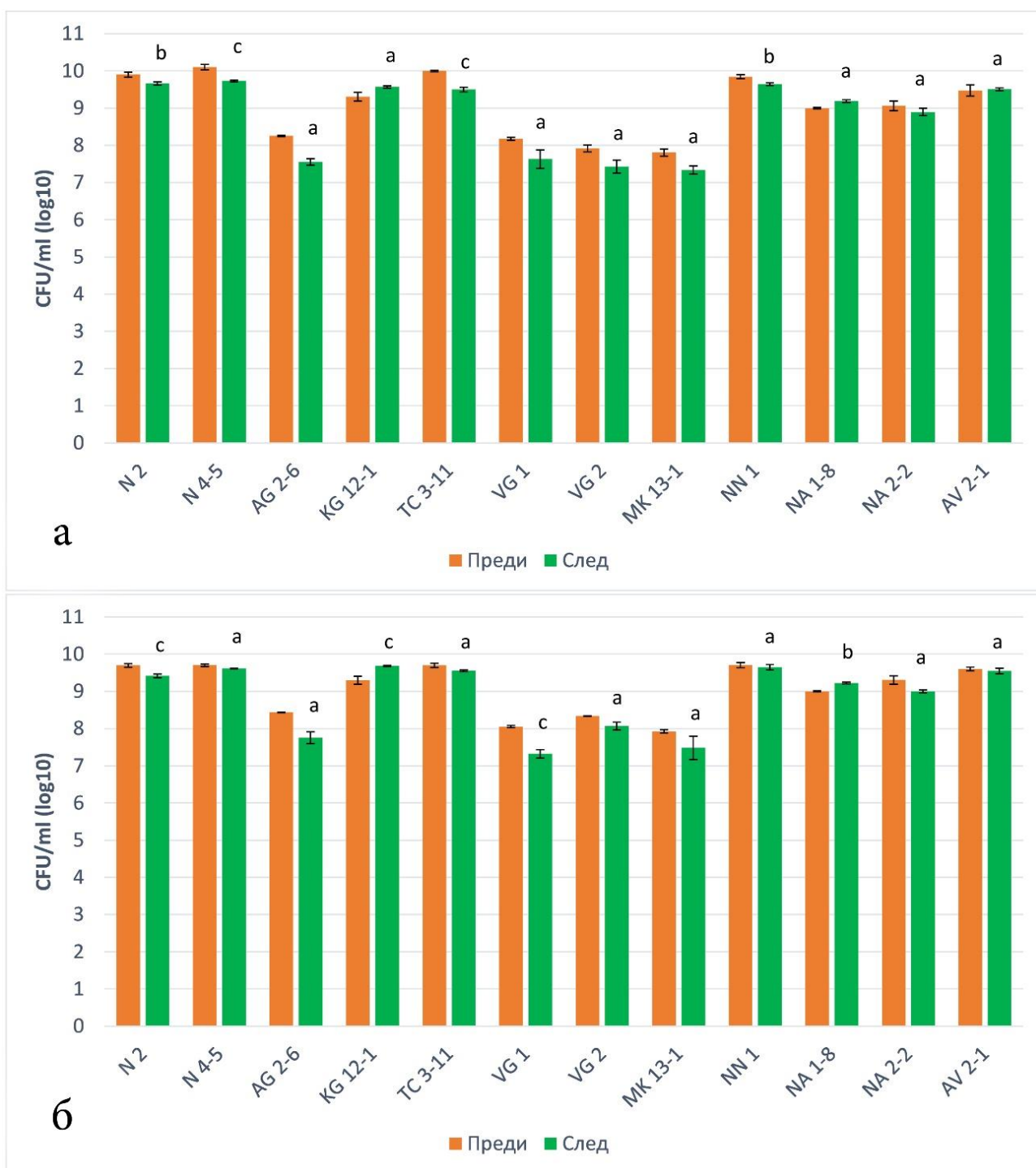
Определяне на технологичното приложение на МКБ с пробиотичен потенциал включва като важна технологична характеристика и оценка на тяхната стабилност и преживяемост при различни технологични процеси (Fonseca et al., 2015). За успешното провеждане на процеса на лиофилизация и за да се осигури минимизиране на негативните изменения върху лиофилизираните бактериални клетки, включително такива като инактивацията на мембранни липиди или редуциране структурните промени върху чувствителните белтъци на МКБ е важно да се подберат оптимални условия на процеса, като едно от най-важните е състава на протекторните среди (Nowak and Jakubczyk, 2020). Стабилността на МКБ при продължително съхранение също е от изключително значение. Пробиотичните бактерии трябва да могат да запазят висока клетъчна плътност на жизнеспособни и активни клетки, за да могат успешно да бъдат включени в състава на пробиотични или други продукти (Fenster et al., 2019; Terpou et al., 2019).

За целите на експерименталната работа са конструирани два вида лиопротекторни среди и сублимационното сушене е осъществено чрез асептично зареждане на лиофилните виалки в камерен лиофилизатор, мониторинг на параметрите на процеса и затваряне под вакуум след края на процеса (Фигура 12).



Фигура 12 – Приготвени проби на изследваните щамове МКБ в конструирани лиопротекторни среди преди лиофилизация (а) и в края на процеса на лиофилизация (б).

Непосредствено след лиофилизация е оценена преживяемостта на изследваните щамове, както и след периоди на съхранение за четири и осем месеца при 4°C чрез определяне на CFU. Резултатите показват, че подбраните лиопротекторни среди запазват жизнеспособността на щамове стабилна по време на лиофилизация (Фигура 13).



Фигура 13 – Жизнеспособност на изследваните щамове МКБ след процес на лиофилизация в лиопротектори SML (а) и SMT (б). Представени са средните стойности \pm SD. One-way ANOVA + post-hoc Tukey test: а – $p > 0.05$; б и с – $p < 0.05$ и $p < 0.01$, съответно. Щамове: *L. fermentum* N 2, *L. fermentum* N 4-5, *W. confusa* AG 2-6, *L. curvatus* KG 12-1, *L. fermentum* TC 3-11, *L. delbrueckii* subsp. *sunkii* VG 1, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* VG 2, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* МК 13-1, *W. confusa* NN 1, *L. rhamnosus* NA 1-8, *L. fermentum* NA 2-2 и *L. paracasei* AV 2-1.

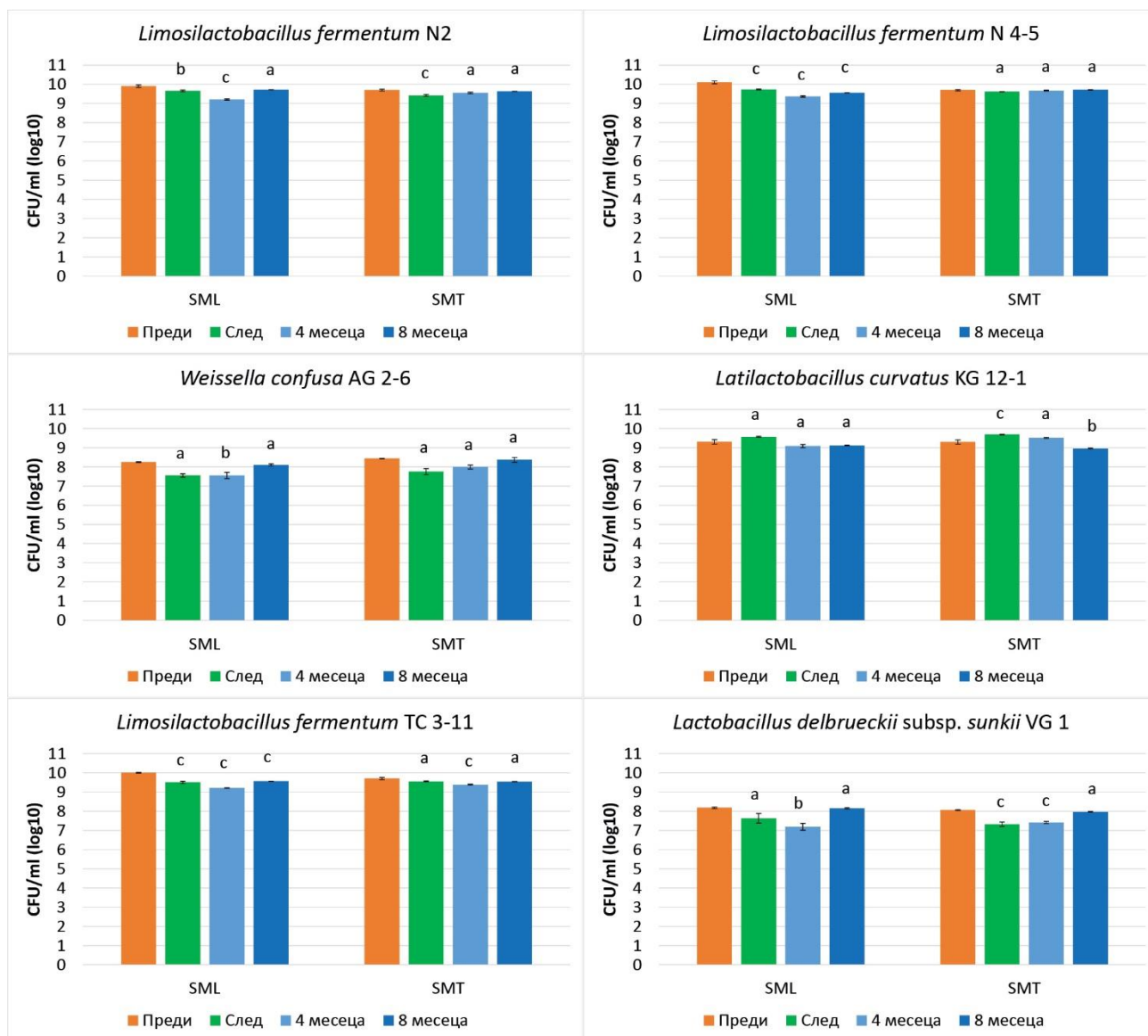
При лиопротекторна среда SML, *L. fermentum* N 2, *L. curvatus* KG 12-1, *W. confusa* NN 1, *L. rhamnosus* NA 1-8 и *L. paracasei* AV 2-1 запазват клетъчна плътност от 10^9

CFU/mL и *L. delbrueckii* subsp. *lactis* VG 2 и МК 13-1 от 10^7 CFU/mL след приключване на процеса на лиофилизация. При щам *L. fermentum* NA 2-2 не се наблюдава статистически значима разлика в CFU/mL, при *L. fermentum* N 4-5 и TC 3-11 има незначително понижение, но клетъчната плътност е до 10^9 CFU/mL, а при *W. confusa* AG 2-6 and *L. delbrueckii* subsp. *sunkii* VG 1 до 10^7 CFU/mL. В лиопротекторна среда SMT, *L. fermentum* N 2, N 4-5, TC 3-11 и NA 2-2, *L. curvatus* KG 12-1, *W. confusa* NN 1, *L. rhamnosus* NA 1-8 и *L. paracasei* AV 2-1 запазват клетъчна плътност в порядък от 10^9 CFU/mL, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* VG 2 запазва 10^8 CFU/mL и *L. delbrueckii* subsp. *lactis* МК 13-1 запазва 10^7 CFU/mL след края на процеса. При щамовете *W. confusa* AG 2-6 and *L. delbrueckii* subsp. *sunkii* VG 1 се наблюдава известно понижаване, но клетъчната плътност достига до 10^7 CFU/mL. Промяната в жизнеспособността при някои от изследваните щамове след лиофилизация е по-малко от един логаритмичен порядък и в двата вида конструирани лиопротектора, което означава, че двете лиопротекторни среди осигуряват висока стабилност на МКБ при процес на лиофилизация.

Резултатите след продължителен период на съхранение показват, че всички изследвани щамове МКБ запазват висока жизнеспособност след четири и осем месеца при 4°C (Фигура 14.1; 14.2).

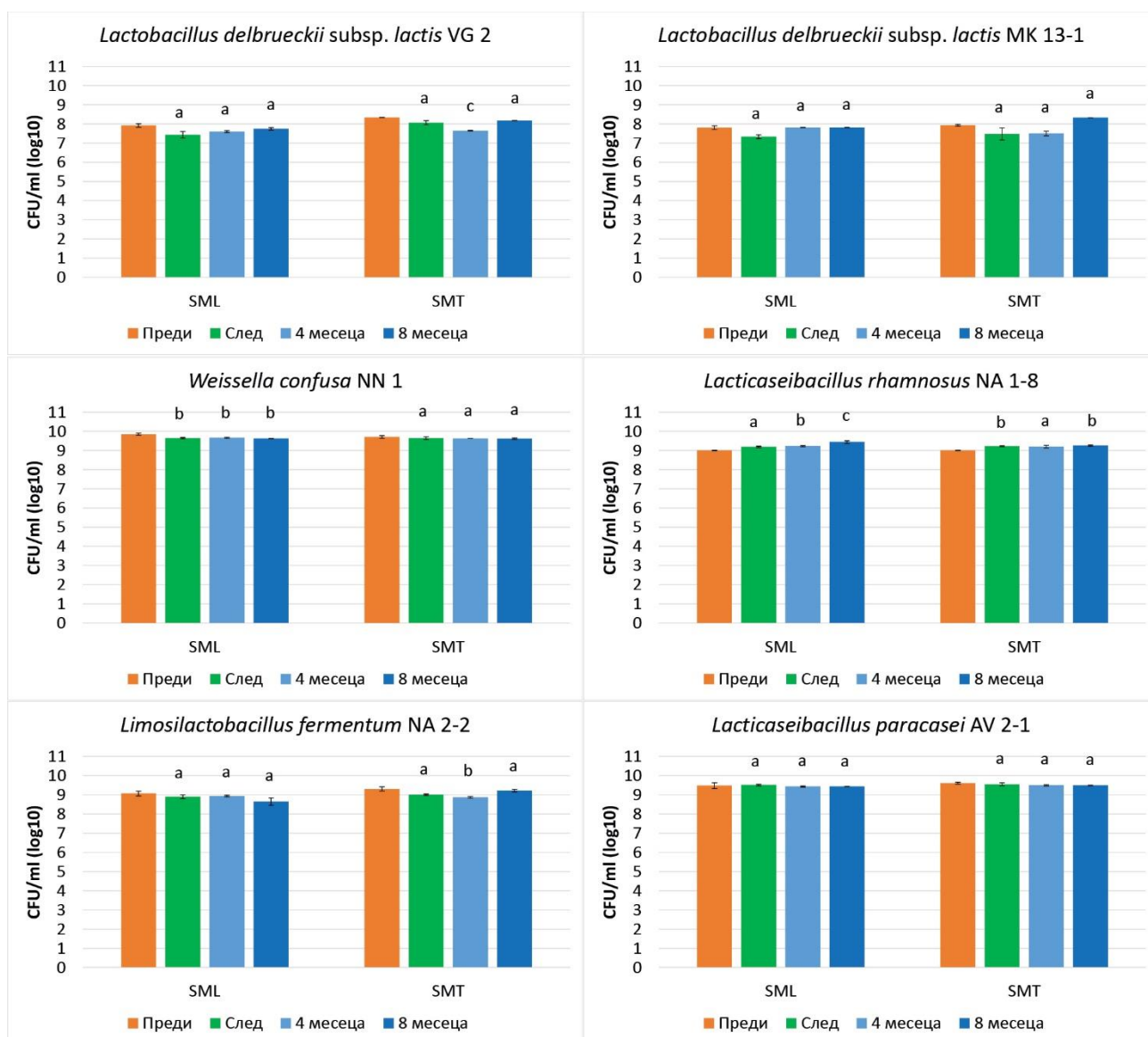
При лиопротекторна среда SML, *L. fermentum* N 2, *L. curvatus* KG 12-1, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* VG 2 и МК 13-1, *W. confusa* NN 1, *L. rhamnosus* NA 1-8 и *L. paracasei* AV 2-1 запазват клетъчната си плътност непроменена през целия период на съхранение. При лиопротекторна среда SMT, *L. fermentum* N 2, N 4-5 и TC 3-11, *W. confusa* NN 1, *L. rhamnosus* NA 1-8 и *L. paracasei* AV 2-1 запазват непроменена клетъчна плътност за осем-месечния период на съхранение. Докато при щамовете *L. fermentum* N 2, *L. curvatus* KG 12-1, *W. confusa* NN 1, *L. rhamnosus* NA 1-8 и *L. paracasei* AV 2-1 не се забелязват разлики при CFU/mL и при двата използвани лиопротектора, то включването на щамовете *L. fermentum* N 4-5, TC 3-11 и NA 2-2, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* VG 2 и *W. confusa* AG 2-6 в лиопротектор SMT определя по-добра стабилност.

В изследване на Montel Mendoza et al., авторите са оценили щамове *Lactococcus* и щам *L. plantarum* CRL 1606 в девет формулировки на лиопротекторна среда, където две от тях, съставени от обезмаслено мляко с лактоза и само от лактоза, са показали много добро поддържане жизнеспособността на щамовете след лиофилизация (Montel Mendoza et al., 2014). Jalali et al. оценили десет вида лиопротектори с различно компонентно съотношение на обезмаслено мляко, трехалоза и натриев аскорбат. При проведена лиофилизация на *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *tolerans* DSM 20258 и *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSM 20081, лиопротектор съставен от 6 % обезмаслено мляко, 8 % трехалоза и 4 % натриев аскорбат е показал, че поддържа най-ефективно стабилността на щамовете (Jalali et al., 2012). В изследвания на Gul et al. и Ren et al., авторите са използвали различни протекторни среди, съставени от обезмаслено мляко, трехалоза и захароза за лиофилизация на *L. salivarius*, *Ligilactobacillus agilis* и *L. curvatus* N 19. Резултатите са показали, че увеличението концентрацията на обезмаслено мляко повишава клетъчната жизнеспособност, а трехалозата и захарозата запазват клетъчната стабилност след лиофилизация (Ren et al., 2019; Gul et al., 2020a).



Фигура 14.1 – Жизнеспособност на изследваните щамове МКБ след съхранение на 4°C за четири и осем месеца в лиопротектори SML и SMT. Представени са средните стойности ± SD. One-way ANOVA + post-hoc Tukey test: a – $p > 0.05$; b и c – $p < 0.05$ и $p < 0.01$, съответно.

В обобщение може да се определи, че щамове *L. fermentum* N 2, *W. confusa* NN 1, *L. rhamnosus* NA 1-8 и *L. paracasei* AV 2-1 показват по-добра преживяемост при процес на лиофилизация и запазват по-добра жизнеспособност след продължително съхранение и при двете лиопротекторни среди. Лиопротекторна среда SML определя по-добра стабилност при съхранение за *W. confusa* NN 1, *L. rhamnosus* NA 1-8 и *L. paracasei* AV 2-1, а лиопротектор SMT за *L. fermentum* N 2, N 4-5 и TC 3-11, *W. confusa* NN 1, *L. rhamnosus* NA 1-8 и *L. paracasei* AV 2-1. Тези резултати посочват, че стабилността на изследваните щамове се запазва по-ефективно при добавяне на трехалоза в компонентния състав на лиопротекторната среда.



Фигура 14.2 – Жизнеспособност на изследваните щамове МКБ след съхранение на 4°C за четири и осем месеца в лиопротектори SML и SMT. Представени са средните стойности ± стандартно отклонение. One-way ANOVA + post-hoc Tukey test: a – $p > 0.05$; b и c – $p < 0.05$ и $p < 0.01$, съответно.

Редица автори са докладвали по-високи нива на преживяемост при дълготрайно съхранение при 4°C (Shu et al., 2018; Savedboworn et al., 2019; Gul et al., 2020b). В изследването на Jalali et al., проучените *L. paracasei* subsp. *tolerans* DSM 20258 и *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSM 20081 са показали висока стабилност в протектор, съставен от 6 % обезмаслено мляко, 8 % трехалоза и 4 % натриев аскорбат, след съхранение на 4°C за три месеца (Jalali et al., 2012). В две изследвания на Gul et al., щамовете *L. curvatus* N 19 и *L. brevis* ED25 са съхранявани за шест месеца при 4°C в протектори с оптимизиран компонентен състав (20 % обезмаслено мляко, 3.57 % лактоза, 10 % захароза и 17.28 % обезмаслено мляко, 2.12 % лактоза, 10 % захароза), при което е определена добре изразена стабилност на щамовете, като понижаването на жизнеспособността е отчетена под един логаритмичен порядък (Gul et al., 2020a;

Gul et al., 2020b). В изследване на Sun et al., авторите докладват, че добавянето на трехалоза в състава на протекторни среди за лиофилизация значително е повишило преживяемостта на *L. plantarum* LP105 след 240 дни на съхранение при 4°C, като понижаването на жизнеспособността на щама е отчетена също под един порядък (Sun et al., 2021).

9. Стабилност и преживяемост на селекция от изследваните щамове МКБ в различни формулировки на моделен продукт за орално здраве

9.1. Определяне на пробиотичен потенциал и селектиране на щамове за включване в състава на моделни пробиотични продукти

Пробиотичният потенциал на изследваните щамове МКБ е определен като се вземат предвид проведените анализи за спектър от функционални и пробиотични свойства и спрямо получените резултати от тези анализи като е приложена точкова система за формиране на комплексна оценка. Пробиотичният потенциал на изследваните щамове с точките по отделните показатели и комплексната оценка като проценти са представени в Таблица 11 и на Фигура 15.

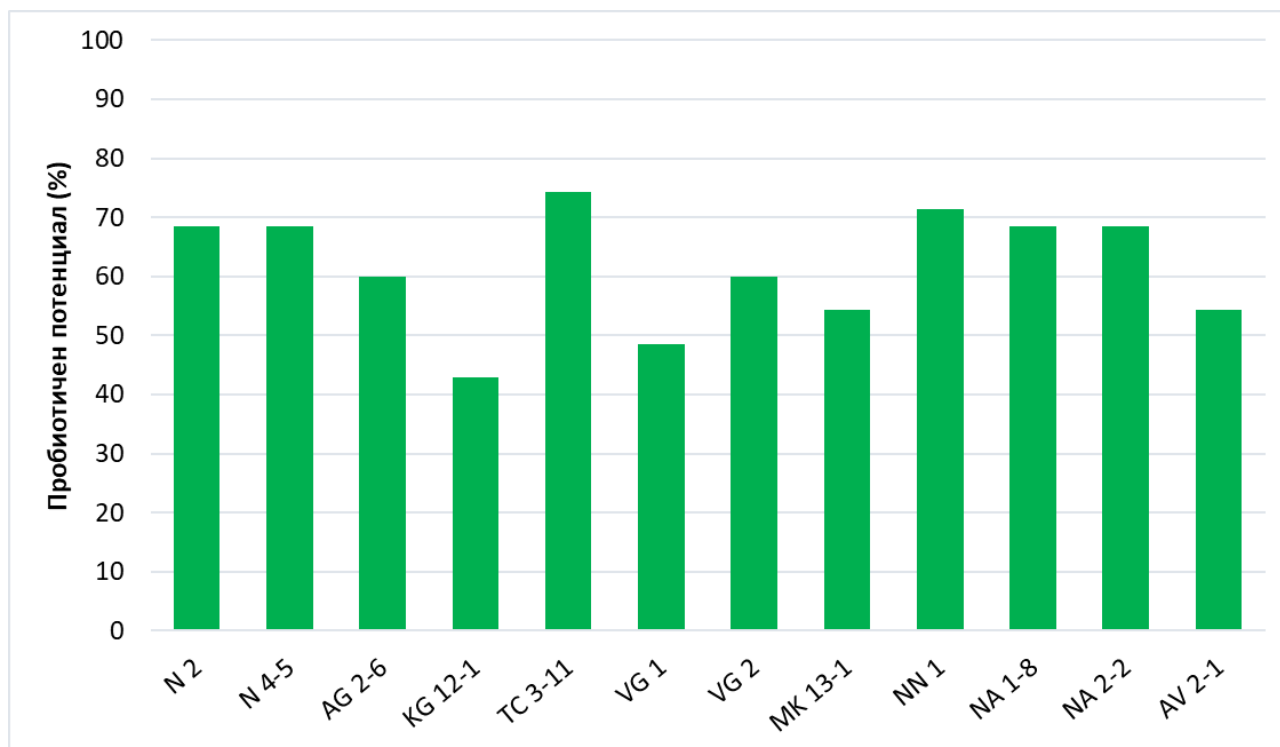
На базата на комплексния анализ може да се отчете, че повечето от щамове притежават пробиотичен потенциал над 60 %, като с най-висок процент е определен при щам *L. fermentum* TC 3-11 – 74.3 %, следван от 71.1 % при *W. confusa* NN 1, 68.6 % при щамове *L. fermentum* N 2, N 4-5, NA 2-2 и *L. rhamnosus* NA 1-8 и 60.0 % при *L. delbrueckii* subsp. *lactis* VG 2 и *W. confusa* AG 2-6.

След анализиране на комплексната оценка и резултатите за изява на конкретни свойства са подбрани два от изследваните щамове с изразени функционални и пробиотични характеристики. Спрямо резултатите от изследванията четирите щама от вида *L. fermentum* притежават изразен комплексен пробиотичен потенциал, като по един от основните критерии за селектиране на пробиотични щамове при тях се отчита и много добро ниво на преживяемост и потенциал за развитие в присъствие на стресови фактори, характерни за ГИТ и в частност за устната кухина. При четирите щама от този вид се наблюдават и изразени автоагрегация и способност за свързване с муцин. Една от основните характеристики е проявяването на най-отчетливо изразена антагонистична активност срещу двата орални тест-патогена *S. mutans* и *C. albicans*. От тази група от четири изследвани щама е избран щам *L. fermentum* N 2.

Втората по брой група от щамове от един вид са трите изследвани щама *L. delbrueckii*, при които се наблюдава широка антимикробна активност срещу Грам+ и Грам- патогени *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *Ps. aeruginosa* и *S. aureus*. При тях също се определя преживяемост в симулирани условия на устната кухина, както и способност за свързване с муцинови белтъци. От трите щама е избран *L. delbrueckii* subsp. *lactis* VG 2, тъй като проявява активност за продуциране на собствен биофилм и коагрегационни свойства.

Таблица 11 – Пробиотичен потенциал на изследваните щамове МКБ.

Пробиотична характеристика	<i>L. fermentum</i> N 2	<i>L. fermentum</i> N 4-5	<i>W. confusa</i> AG 2-6	<i>L. curvatus</i> KG 12-1	<i>L. fermentum</i> TC 3-11	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>sunkii</i> VG 1	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> VG 2	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> MK 13-1	<i>W. confusa</i> NN 1	<i>L. rhamnosus</i> NA 1-8	<i>L. fermentum</i> NA 2-2	<i>L. paracasei</i> AV 2-1
Преживяемост при орален стрес	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Преживяемост при пряко въздействие на горните отдели на ГИТ	2	2	1	0	2	0	1	1	1	2	2	0
Развитие в присъствие на стресови фактори в устната кухина	2	2	2	0	2	0	0	0	2	2	2	2
Развитие в присъствие на стресов фактор 0.3% жлъчни соли	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1
Агрегационен потенциал	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2
Свързване с муцин	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Наличие на генетични детерминанти за адхезини и лектини	1	1	2	2	1	1	1	1	2	2	1	2
Формиране на биофилм	2	3	1	1	3	2	3	2	2	2	2	1
Антибиотична резистентност (МАР индекс)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Антимикробна активност (общо 9 тест-патогена)	3	3	4	0	4	5	5	5	4	2	3	2
Генетични детерминанти за бактериоцини	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1
Антагонистична активност с/у орален тест патоген <i>S. mutans</i>	2	1	1	1	2	1	1	1	2	2	2	1
Антагонистична активност с/у орален тест патоген <i>C. albicans</i>	2	2	1	2	2	1	2	2	2	2	2	2
Инхибиране формирането на биофилм при <i>S. mutans</i>	2	2	2	2	2	0	1	0	2	2	2	0
Инхибиране формирането на биофилм при <i>C. albicans</i>	2	2	2	1	2	1	1	1	2	1	2	1
Получен резултат	24	24	21	15	26	17	21	19	25	24	24	19
Максимален резултат	35											



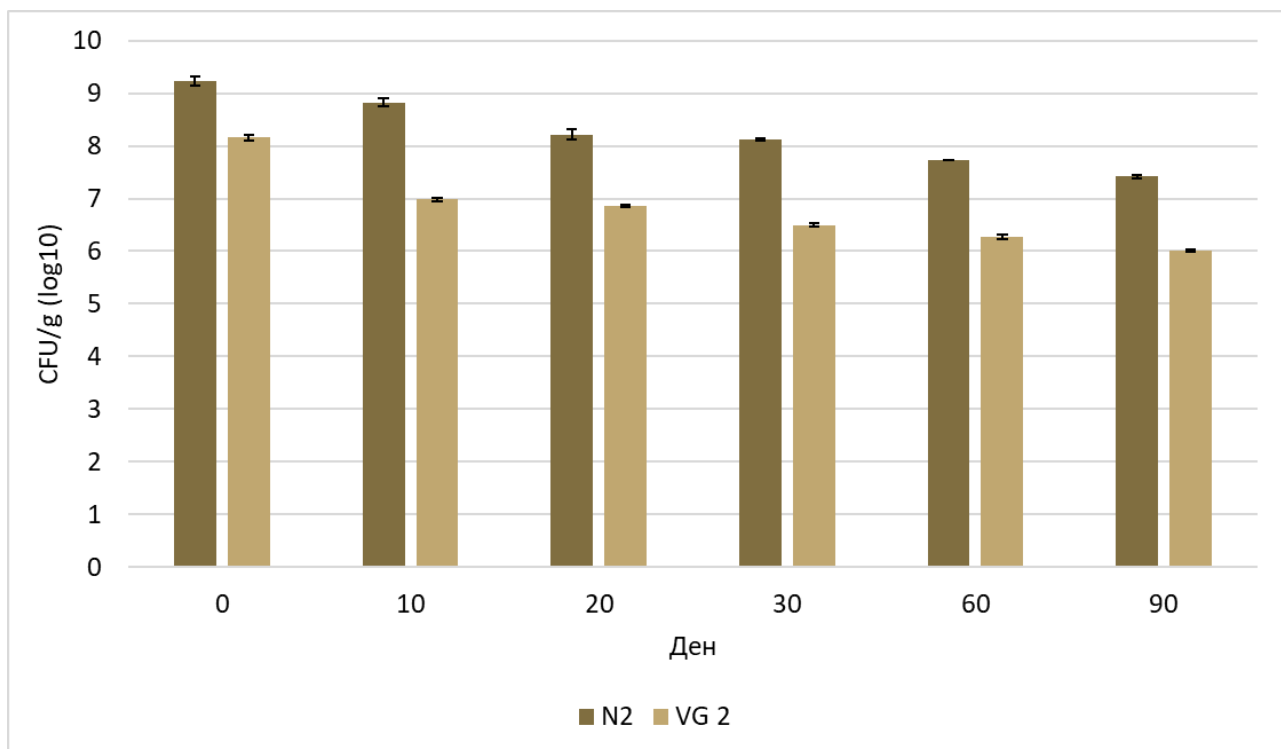
Фигура 15 – Пробиотичен потенциал на изследваните щамове МКБ. Щамове: *L. fermentum* N 2, *L. fermentum* N 4-5, *W. confusa* AG 2-6, *L. curvatus* KG 12-1, *L. fermentum* TC 3-11, *L. delbrueckii* subsp. *sunkii* VG 1, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* VG 2, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* MK 13-1, *W. confusa* NN 1, *L. rhamnosus* NA 1-8, *L. fermentum* NA 2-2 и *L. paracasei* AV 2-1.

9.2. Оценка жизнеспособността на селектираните щамове при включване в различни моделни продукти под формата на свежа концентрирана култура

Запазването на жизнеспособността на МКБ е от ключово значение за ефективно постигане на желаните ефекти при техния прием като част от състава на пробиотичните продукти. Поддържането на висока клетъчна плътност се осигурява чрез различни хранителни матрици, с определен компонентен състав и под конкретна форма на съхранение и приложение – сашета, капсули, таблетки, бонбони и др. В зависимост от това, се осигурява защита в различни степени от фактори, които са отговорни за загуба на клетъчна жизнеспособност по време на съхранение, включително температура, високо водно съдържание и кислород (Wilcox et al., 2020).

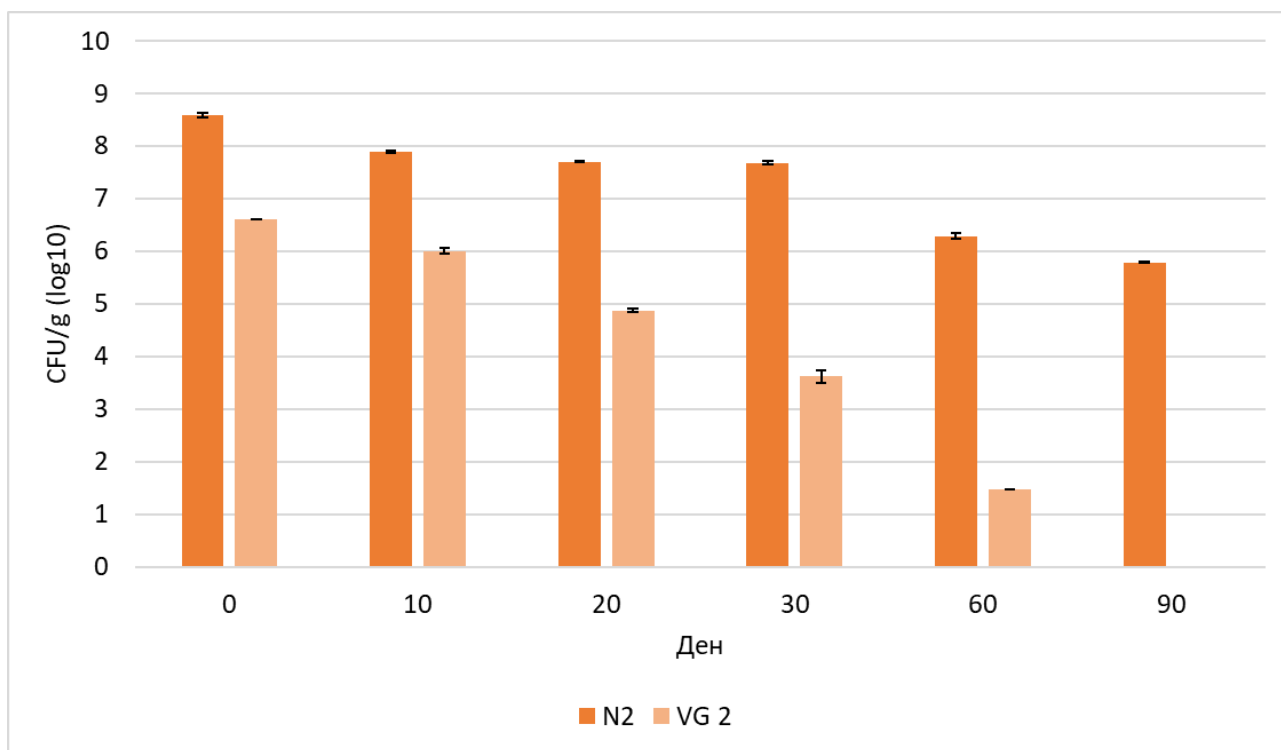
Оценена е жизнеспособността на двата селектирани щама след включване в два типа моделен продукт, както и след съхранение за 90 дни при 4°C, като те са включени под формата на свежа концентрирана култура. Резултатите при моделен продукт на какаова основа показват, че непосредствено след формоване, при *L. fermentum* N 2 се установява начална клетъчна концентрация от 10^9 CFU/g, докато *L. delbrueckii* subsp. *lactis* VG 2 се установява начална концентрация от 10^8 CFU/g (Фигура 16). По време на съхранение, *L. fermentum* N 2 запазва клетъчна плътност до 30-ти ден с порядък от

10⁸ CFU/g, а до 90-ти ден клетъчната плътност се запазва с порядък от 10⁷ CFU/g. При *L. delbrueckii* subsp. *lactis* VG 2 се наблюдава запазване на жизнеспособността с порядък от 10⁶ CFU/g от 10-ти до 90-ти ден на съхранение.



Фигура 16 – Жизнеспособност на селектираните щамове МКБ при включване в свежа форма в моделен продукт на какаова основа и съхранение на 4°C за 90 дни. Представени са средните стойности ± SD. One-way ANOVA + post-hoc Tukey test ($p < 0.01$). Щамове: *L. fermentum* N 2, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* VG 2.

При моделния продукт на агарова основа резултатите показват, че непосредствено след формоване, при *L. fermentum* N 2 се установява начална клетъчна концентрация от 10⁸ CFU/g, а при *L. delbrueckii* subsp. *lactis* VG 2 се установява начална концентрация от 10⁶ CFU/g (Фигура 17). По време на съхранение на пробите с *L. fermentum* N 2 се запазва клетъчна плътност до 30-ти ден с порядък от 10⁷ CFU/g, но при по-късните времеви проби на 60-ти ден клетъчната плътност е 10⁶ CFU/g, а на 90-ти ден е 10⁵ CFU/g. При *L. delbrueckii* subsp. *lactis* VG 2 се наблюдава запазване на жизнеспособността с порядък от 10⁶ CFU/g само до 10-ти ден на съхранение. След 20-ти ден е отчетена клетъчна плътност с порядък от 10⁴ CFU/g, на 30-ти ден – 10³ CFU/g и на 60-ти ден – 10¹ CFU/g. На 90-ти не е отчетена жизнеспособност на изследвания щам в агаровия моделен продукт.



Фигура 17 – Жизнеспособност на селектираните щамове МКБ при включване в свежа форма в моделен продукт на агарова основа и съхранение на 4°C за 90 дни. Представени са средните стойности \pm SD. One-way ANOVA + post-hoc Tukey test ($p < 0.01$). Щамове: *L. fermentum* N 2, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* VG 2.

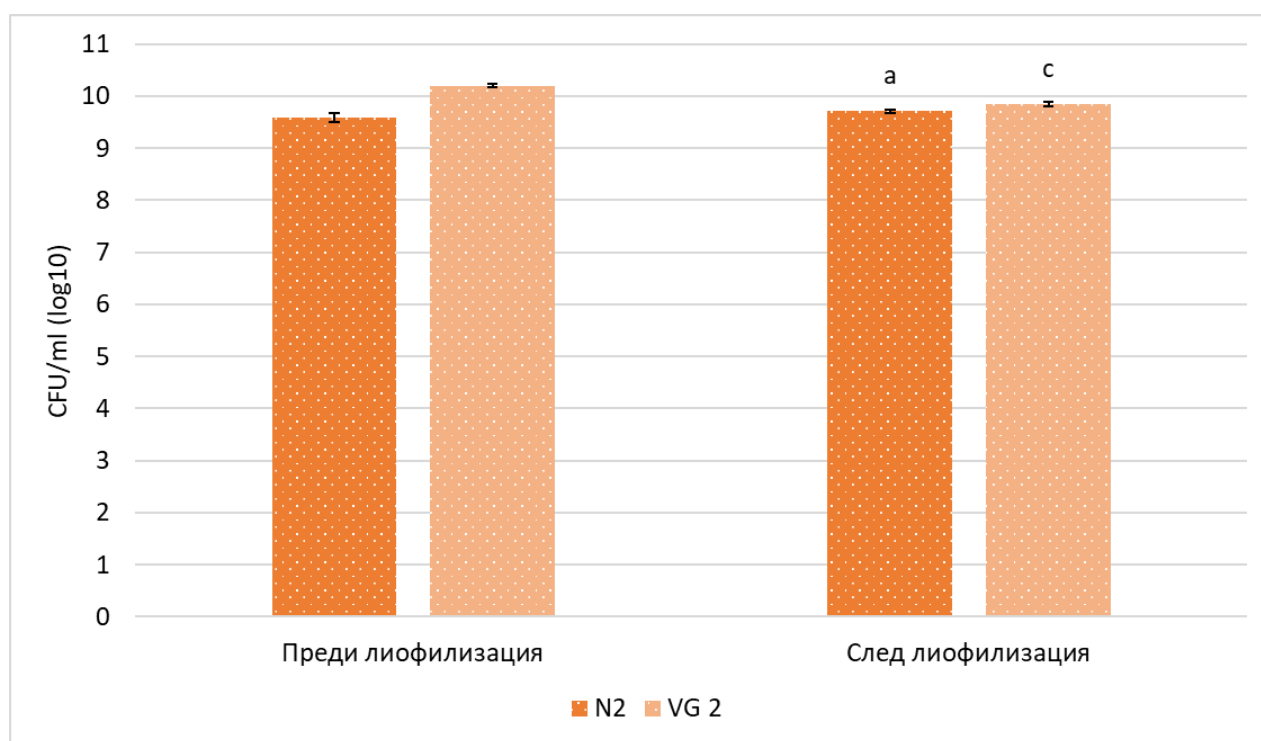
От получените данни може да се отчете, че в моделния продукт на какаова основа и двата изследвани щама запазват стабилна жизнеспособност, като се наблюдава понижаване на клетъчната им плътност до два логаритмични порядъка за целия период на съхранение. Докато при агаровия моделен продукт при *L. fermentum* N 2 се отчита понижаване на клетъчната плътност до три порядъка за периода на съхранение, а при *L. delbrueckii* subsp. *lactis* VG 2 се наблюдава отчетливо понижаване на CFU. Това определя моделния какаов продукт като по-подходяща матрица за поддържане стабилността и жизнеспособността на включени в състава му пробиотични щамове под формата на свежа култура.

В изследване на Foong et al., авторите са оценили щам *L. plantarum*, включен в състава на моделен продукт с високо съдържание на какао. При продължително съхранение за три месеца е отчетено с по-малко от два логаритмични порядъка разлика спрямо началната концентрация в продукта (Foong et al., 2013). Succì et al. са добавили щамове *L. casei* DG, *L. paracasei* F19, *L. rhamnosus* GG и *L. reuteri* DSM17938 в какаов продукт, като са отчетели преживяемостта на отделните щамове след 90 дни съхранение. Резултатите са показали жизнеспособност на *L. paracasei* F19 и *L. rhamnosus* GG с порядък от 10^8 CFU/dose, *L. casei* DG с порядък от 10^7 CFU/dose и *L. reuteri* DSM17938 с порядък от 10^6 CFU/dose до края на периода на съхранение (Succì et al., 2017). Изследване на Hossain et al. е оценило преживяемостта на щамове *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, внесени в какаов продукт. От резултатите, авторите са

установили, че преживяемостта на щамовете е по-висока при съхранение на 4°C и в рамките на 90 дни е отчетена с 3–5 порядъка разлика спрямо стартиращата концентрация в продукта (Hossain et al., 2022).

9.3. Оценка жизнеспособността на селектираните щамове при включване в моделен продукт в лиофилизирана форма

Изследван е потенциала за запазване на жизнеспособността на двата селектирани щама при включване в лиофилизирана форма в агарова формулировка на моделен продукт и след съхранение за 90 дни на 4°C. Първоначално са подбрани компоненти и е конструирана подходяща протекторна среда, с която да се получи лифилизиран материал от двата изследвани щама и която ще бъде подходяща за включване и в крайния моделен продукт. На първия етап от тази експериментална задача е оценена преживяемостта на двата щама при процес на лиофилизация с приложения на конструираната протекторна среда. Резултатите показват, че конструирания лиопротектор запазва жизнеспособността на щамовете след лиофилизация (Фигура 18).

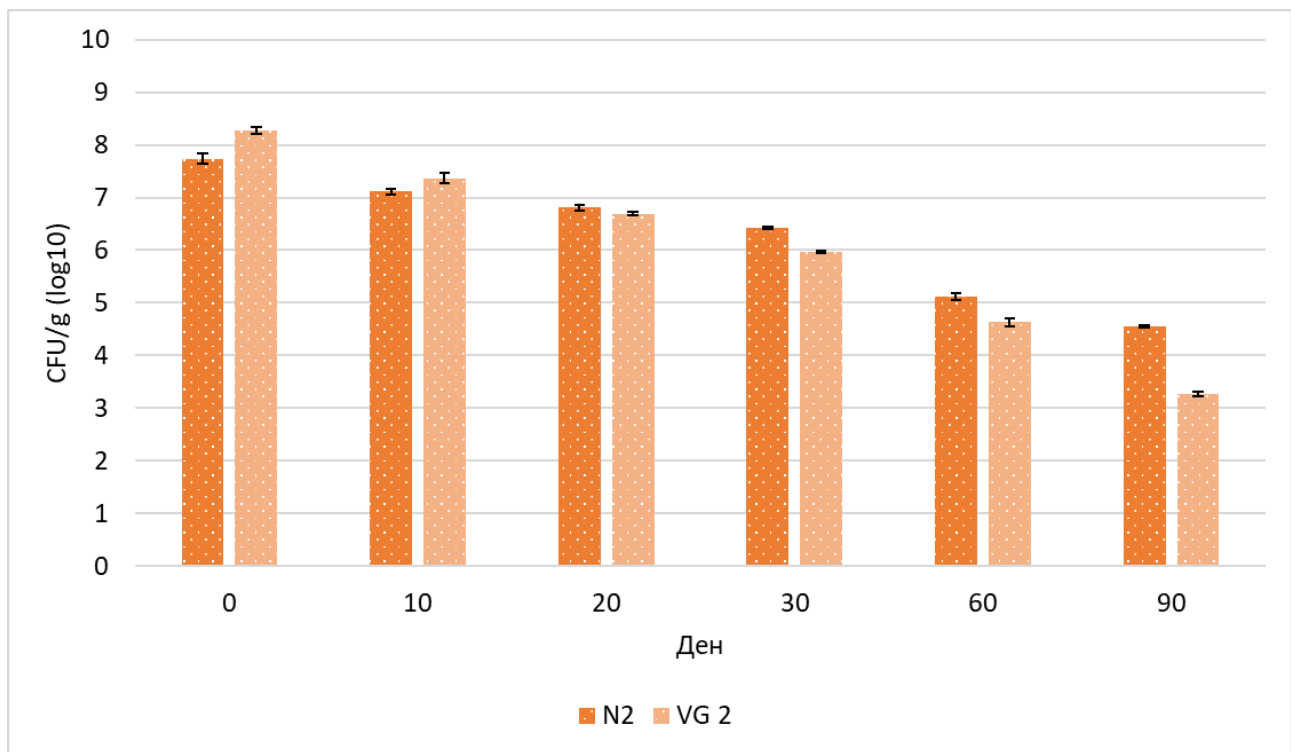


Фигура 18 – Жизнеспособност на селектираните щамове МКБ при процес на лиофилизация с новоконструираната протекторна среда. Представени са средните стойности \pm SD. One-way ANOVA + post-hoc Tukey test: a – $p > 0.05$; c – $p < 0.01$, съответно. Щамове: *L. fermentum* N 2, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* VG 2.

При *L. fermentum* N 2 е отчетено запазване на клетъчна плътност с порядък от 10^9 CFU/mL, докато клетъчната концентрация при *L. delbrueckii* subsp. *lactis* VG 2 с по-малко от един логаритмичен порядък. Получените резултати доказват, че

новоконструираната лиопротекторната среда осигурява висока стабилност на МКБ при процес на лиофилизация.

Леофилизираните култури на двата селектирани щама са включени в агаров моделен продукт. Непосредствено след включване при *L. fermentum* N 2 се установява начална клетъчна концентрация от 10^7 CFU/g, а при *L. delbrueckii* subsp. *lactis* VG 2 се установява начална концентрация от 10^8 CFU/g (Фигура 19). По време на съхранение до 10^{-ти} ден *L. fermentum* N 2 запазва клетъчна плътност с непроменен порядък, а при по късните времеви точки 30^{-ти} ден е 10^6 CFU/g, на 60^{-ти} и 90^{-ти} ден клетъчната плътност е отчетена съответно с порядък от 10^5 и 10^4 CFU/g. При *L. delbrueckii* subsp. *lactis* VG 2 се наблюдава понижаване на жизнеспособността с около един порядък на всяка времева точка на отчитане, като на 90^{-ти} ден концентрацията на щама е отчетена с порядък от 10^3 CFU/g.



Фигура 19 – Жизнеспособност на селектираните щамове МКБ след формоване в лиофилизирана форма в моделен продукт на агарова основа и съхранение на 4°C за 90 дни. Представени са средните стойности \pm SD. One-way ANOVA + post-hoc Tukey test ($p < 0.01$). Щамове: *L. fermentum* N 2, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* VG 2.

От получените данни се установява, че предварителната лиофилизация подобрява стабилността и преживяемостта и при двата щама при внасяне в моделния агаров продукт. При *L. fermentum* N 2 се наблюдава, че запазва своята стабилност както в свежа, така и в лиофилизирана форма, като и при двата агарови моделни продукта се отчита с до три логаритмични порядъка разлика на 90^{-ти} ден спрямо началната концентрация на културата. При *L. delbrueckii* subsp. *lactis* VG 2 отчетливо се наблюдава, че добавянето му в агаровия продукт в лиофилизирана форма

подобрява стабилността и преживяемостта на щама. Началната клетъчна концентрация на културата при внасяне в продукта е отчетена с два порядъка по-висока спрямо началната при добавяне в свежа форма. Също така, през целия период на съхранение се отчитат по-високи стойности на жизнеспособност като на 90^{ти} ден също се наблюдава преживяемост.

В изследване на Zavistanaviciute et al., авторите оценяват няколко щама МКБ добавени под лиофилизирана форма в състава на дъвчащи бонбони. От резултатите са установили, че след съхранение за близо един месец е отчетена с 1–2 логаритмични порядъка разлика в жизнеспособността на щамовете спрямо стартиращата концентрация в продукта (Zavistanaviciute et al., 2022).

9.4. Оценка за наличие на странична микрофлора в готовите моделни продукти

За пробиотичните продукти е нужно да преминат през различни етапи на качествен контрол, за да може да бъде осигурена тяхната безопасна употреба. Микробиологичните контролни тестове включват не само определяне на общия брой жизнеспособни клетки на пробиотичните микроорганизми, но и тестове за микробиологична чистота (Zavišić et al., 2023). Пробиотичните продукти в зависимост от категорията на конкретната продуктова група се контролират за микробиологична чистота и безопасност, като се проследяват отсъствие на индикаторни контаминанти, каквито са *E. coli* и *Salmonella* sp., като изискванията за всяка отделна продуктова група се регулират от Европейската и Американската фармакопея, Агенцията за контрол на храните и лекарствата и Европейската комисия (Zawistowska-Rojek et al., 2022). В зависимост от начина на приложение, за продуктите съдържащи живи микроорганизми се установяват максимално допустими стойности на общо микробно число за аеробни микроорганизми и дрожди и плесени. За целите на контрола се използват разнообразни хранителни среди и условия на инкубиране, които са специфични за изследвания продукт и микроорганизмите в него (Zawistowska-Rojek et al., 2022).

Пригответените моделни продукти са анализирани за общ брой сапрофитни микроорганизми и *E. coli* (Таблица 15). По показателя общ брой сапрофитни микроорганизми, при двата моделни продукта на агарова основа не е отчетено наличие на странична микрофлора при така подготвените за анализ проби до 90^{ти} ден на съхранение. При моделния продукт на какаова основа, който е приготвен с изходни суровини, които не са преминали през предварителен етап на стерилизация, се отчита наличие на странична микрофлора при пробите с щам *L. fermentum* N 2 до 60^{ти} ден, а при пробите с *L. belbrueckii* subsp. *lactis* VG 2 до 90^{ти} ден, като общото микробно число аеробни микроорганизми е под 100 CFU/g (Таблица 15). При нито една от така пригответените за анализ проби на моделни продукти не е отчетено наличие на *E. coli* като съгласно възприетите в практиката стандарти, тези резултати се изразяват като < 10 CFU/g.

Таблица 12 – Оценка за наличие на общ брой сапрофитни микроорганизми и *E. coli* в готовите моделни продукти след съхранение на 4°C за 90 дни.

Продукт	CFU/g	ден					
		0	10	20	30	60	90
Какаов продукт + N 2 (свежа култура)	Общ бр. МО	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100	< 10
	<i>E. coli</i>	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Агаров продукт + N 2 (свежа култура)	Общ бр. МО	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
	<i>E. coli</i>	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Агаров продукт + N 2 (лиофилизирана форма)	Общ бр. МО	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
	<i>E. coli</i>	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Какаов продукт + VG 2 (свежа култура)	Общ бр. МО	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100
	<i>E. coli</i>	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Агаров продукт + VG 2 (свежа култура)	Общ бр. МО	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
	<i>E. coli</i>	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Агаров продукт + VG 2 (лиофилизирана форма)	Общ бр. МО	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
	<i>E. coli</i>	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10

При моделния продукт на какаова основа, отчетената странична микрофлора е постъпила с внасянето на суровата какаова маса, както не подлежи на високотемпературна обработка поради естество си, но спрямо приетите национални и европейски изисквания за продуктите, съдържащи живи микроорганизми, които не са преминавали през етапи на термична обработка, допустимият титър на обща сапрофитна микрофлора не трябва да надвишава 1000 CFU/g (Еникова, НЦООЗ). Съгласно така получените резултати, общо трите варианта на моделни продукти с включени двата подбрани щама могат да бъдат определени като безопасни за употреба.



В заключение може да се обобщи, че изследваните новоизолирани щамове МКБ проявяват пробиотичен потенциал и са подходящи за включване в моделни пробиотични продукти. При селектираните щамове *L. fermentum* N 2 и *L. delbrueckii* subsp. *lactis* VG 2 са определени добри показатели за преживяемост при включването им в конструираните моделни продукти, както като свежи култури в продукт на какаова основа, така и в лиофилизирана форма в продукт на агарова основа. Получените резултати са значима предпоставка за продължаване и разширяване, както на изследванията с новоизолираните щамове, така и на експерименталната работа за разработване на нови продукти за подобряване на оралното здраве.

V. Изводи

1. При таксономичното характеризирание на дванадесетте новоизолирани щама е установено, че четири щама принадлежат към вида *Limosilactobacillus fermentum*, един щам към *Latilactobacillus curvatus*, един щам към *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *sunkii*, два щама към *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, един щам към *Lacticaseibacillus rhamnosus*, един щам към *Lacticaseibacillus paracasei* и към вида *Weisella confusa* принадлежат два щама.
2. Всички изследвани щамове проявяват пептидазни активности и притежават специфичен набор от гени за пептидази, което обуславя потенциал за продуциране на биологично активни пептиди.
3. Всички изследвани щамове показват висока степен на преживяемост при *in vitro* симулирани условия на устната кухина, като повечето от тях успешно се развиват в присъствие на лизозим, което определя потенциал за асоцииране в оралния микробиом и възможност за проява на пробиотичните им свойства.
4. Стресовите фактори в следващите отдели на ГИТ повлияват развитието на изследваните щамове, като повечето от тях успешно преживяват при прякото въздействие на тези фактори.
5. Всички изследвани щамове проявяват изразен адхезивен потенциал, оценен като способност за свързване с муцин и наличие на генетични детерминанти за адхезивни белтъци, както и щамово специфични характеристики по отношение на автоагрегационна способност и способност за формиране на собствен биофилм.
6. Изследваните щамове проявяват широк спектър от антибиотична мултирезистентност с коефициент между 0.385 и 0.615, но от биоинформатичния анализ на данните от цялостните геномни секвенции се установява, че изследваните щамове не притежават придобити гени за антибиотична резистентност.
7. При всички изследвани щамове е установен общ антиоксидантен капацитет, като изразена антиоксидантна активност е отчетена при безклетъчните супернатанти, получени от седем от щамовете.
8. Установена е щамовоспецифична антимикробна активност при изследваните щамове, като при шест щама са установени и генетични детерминанти за продукция на бактериоцини.
9. При ко-култивиране с орални тест-патогени, единадесет от изследваните щамове проявяват изразена антагонистична активност срещу *S. mutans*, а срещу *C. albicans* се отчитат ефекти на инхибиране при осем от изследваните щамове.
10. Изследваните щамове МКБ проявяват коагрегационна способност с оралните тест-патогени *S. mutans* и *C. albicans* и видовоспецифична антибиофилмова активност срещу тези патогени.

11. Изследваните щамове показват много добра преживяемост при процеса на лиофилизация и при използваните два типа конструирани протекторни среди, като при повечето щамове по-добри резултати се отчитат при протекторната среда с добавена трехалоза.
12. При осем от изследваните щамове е определен пробиотичен потенциал над 60% при прилагане на комплексен аналитичен подход.
13. Селектираните щамове *L. fermentum* N 2 и *L. delbrueckii* subsp. *lactis* VG 2 запазват много добра степен на преживяемост при включването им в моделни продукти като свежи култури в продукт на какаова основа и в лиофилизирана форма в продукт на агарова основа, и за период на съхранение до 20 денонощия.

VI. Приноси

1. Изолирани са дванадесет нови щама от човешкия орален микробиом, които са характеризирани и определени до вид чрез прилагане на комбиниран молекулярен подход.
2. Секвенирани са геномите на дванадесетте новоизолирани щама и обработените цели геномни секвенции са депозираны в генетичната база данни на NCBI.
3. Доказана е директната антагонистична активност на изследваните щамове срещу оралните патогени *Streptococcus mutans* и *Candida albicans* чрез комбинация от аналитични методи на ко-култивиране, коагрегация и антибиофилмова активност, като за първи път са представени такива резултати за щамове от видовете *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei* и *Weissella confusa*.
4. Адаптиран е комплексен подход за оценка на пробиотичния потенциал на новоизолираните щамове МКБ чрез прилагане на новоструктурирана точкова система.
5. Формулирани са нови моделни пробиотични продукти с успешно включени два подбрани щама *L. fermentum* N 2 и *L. delbrueckii* subsp. *lactis* VG 2, което е много добра основа за разработване на продукти за подобряване на оралното здраве.

VII. Научни публикации

1. Atanasov, N.; Evstatieva, Y.; Nikolova, D. Probiotic Potential of Lactic Acid Bacterial Strains Isolated from Human Oral Microbiome. *Microbiol. Res.* **2023**, *14(1)*, 262–278. doi: 10.3390/microbiolres14010021, IF (1.5 – 2022)
2. Atanasov, N.; Evstatieva, Y.; Nikolova, D. Antagonistic Interactions of Lactic Acid Bacteria from Human Oral Microbiome against *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *Microorganisms* **2023**, *11(6)*, 1604. doi: 10.3390/microorganisms11061604, IF (4.5 – 2022), Web of Science Quartile: Q2 (2022), SJR (0.909 – 2022), SCOPUS Quartile: Q2 (2022)
3. Atanasov, N.; Trifonova, E.; Evstatieva, Y.; Nikolova, D. Effect of Two Lyoprotectants on the Survival Rate and Storage Stability of Freeze-Dried Probiotic Lactic Acid Bacterial Strains. *JCTM* **2023**, *58(6)*, 1003–1010. doi: 10.59957/jctm.v58i6.1, SJR (0.196 – 2022), SCOPUS Quartile: Q3 (2022)