

СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ “СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ”

БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ

КАТЕДРА “ОБЩА И ПРОМИШЛЕНА МИКРОБИОЛОГИЯ”



**Микрофлора на храносмилателния тракт
на охлюви от сем. *Helicidae***

Здравка Веселинова Колева

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

за присъждане на образователна и научна степен “Доктор”
Професионално направление 4.3. Биологични науки
(Микробиология)

Научни ръководители: проф. д-р П. Мончева
доц. д-р П. Христова

София, 2015

Дисертационният труд съдържа 199 страници на формат А4, 22 таблици и 36 фигури. В библиографската справка са включени 316 заглавия, от които 1 на кирилица и 315 на латиница. Експерименталната работа е извършена в лабораториите на катедра „Обща и промишлена микробиология” на СУ „Св. Климент Охридски” и Агробиоинститут.

Дисертационният труд е обсъден на разширено заседание на катедрата по Обща и промишлена микробиология към Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски”, проведено на 19.12.2014 г. и насрочен за защита пред научно жури, сформирано със заповед на Ректора Софийски университет „Св. Климент Охридски”.

Научно жури: 1. проф. дбн Искра Иванова
2. проф. дсн. Невена Богацевска
3. проф. д-р Илия Илиев
4. доц. д-р Петя Христова
5. доц. д-р Велизар Гочев

Защитата на дисертационния труд ще се състои на от часа в в сградата на Биологически факултет към СУ „Св. Климент Охридски”.

Материалите по защитата се намират на сайта на Биологически факултет и в катедрата по Обща и промишлена микробиология.

Списък на използваните съкращения

ДНК - Дезоксирибонуклеинова киселина

АТСС (American Type Culture Collection) - Американска колекция за микроорганизми

НБИМСС (National Bank for Industrial Microorganisms and Cell Cultures) - Национална банка за промишлени микроорганизми и клетъчни култури

bp (base pair) - базови двойки

CFU (Colony-forming units) – Колония-формиращи единици

ITS (International Transcribed Spacers) – Участък между гените на 16S и 23S в рибозомалния оперон

NCBI (National Center for Biotechnology Information) - <http://www.ncbi.nih.gov/>

PCR (Polymerase Chain Reaction) – Полимеразна верижна реакция

Q-PCR (Quantitative PCR) – Количествен PCR анализ

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) – Полиморфизъм в дължината на амплифицирания фрагмент

T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) - Полиморфизъм по дължината на терминално-рестрикционни фрагменти

ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) - Рестрикционен анализ на амплифицирана рибозомална ДНК

УВОД

Видът *Cornu aspersum* е представител на тип *Mollusca*, клас *Gastropoda*, разред *Pulmonata*, семейство *Helicidae*. Отглеждан е както в специализирани открити и закрити ферми за охлюви, така и може да бъде открит в природни условия. Микробното разнообразие свързано с гастроинтестиналния тракт на *C. aspersum* е изследвано от Watkins and Simkiss (1990), Lesel et al. (1990) и Charrier et al. (2006). В повечето анализи досега авторите изследват чревната микрофлора с цел идентификацията на основните видове микроорганизми и изясняване на тяхната роля в храносмилането и процеса на хранене на гостоприемника. Отсъства информацията относно динамиката на микробните съобщества през различните стадии от развитието на охлювите.

Изследванията в областта на интестиналната микрофлора на охлювите, показват, че доминиращите култивиреми бактерии в храносмилателния тракт на охлювите са основно представители на семейство *Enterobacteriaceae* (Lesel et al., 1990; Watkins and Simkins, 1990) и на род *Enterococcus* (Charrier et al., 1998). Авторите установяват, че най-разпространени в чревния тракт на охлювите са факултативни анаеробни Грам-отрицателни бактерии. През 2006г. екипа на Charrier доказва доминиращата роля на два таксона: γ -*Proteobacteria* (*Buttiauxella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Kluuyvera*, *Obesumbacterium*, *Raoultella*) и *Firmicutes* (*Enterococcus*, *Lactococcus* and *Clostridium*) в тракта на два вида охлюви в етап на аестивация: *C. aspersum* and *Helix pomatia*. Според други автори (Ansart et al., 2010) микробиотата на *C. aspersum* е основно съставена от аероби и факултативни анаероби, доминирани от *Aeromonas* и *Enterobacteriaceae*. Изясняването на микрофлората на охлювите е и от ключово значение за тяхното широко използване в сфери като фармация, козметика, медицина и др.

Охлювите имат незаменими вкусови качества. За консумация в България се използват охлюви от култивиреми вид *C. aspersum*, отглеждан във специализирани ферми, както и от още два вида: *H. pomatia* и *Helix lucorum*, живеещи свободно в природата. Тяхното стопанско значение и разрастващото им се разпространение като здравословна храна изискват задълбочено познаване на

състава и развитието на интестиналната им микрофлората. Един от факторите, който ограничава отглеждането на охлюви са болестите, причинявани от редица патогенни или условно патогенни видове, представляващи потенциална опасност за здравето на консуматора и водещи до намаляване на продукцията им на пазара.

Познаването на видовия състав в чревния тракт на *C. aspersum* е важно, както за крайните консуматори, така и за по-ефективното отглеждане на охлювите във фермерите и намаляване на рисковете от заболявания. Едно от ключовите изисквания за използването на охлювите като храна е познаването на видовия състав във всеки конкретен стадий от тяхното развитие. Това изследване е насочено към изясняване на микрофлората в храносмилателния тракт на охлюви от вида *C. aspersum* в активно (новоизлюпени и активно хранени) и латентно състояние (аестивация и хибернация).

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящата дисертация е изучаване на динамиката и разнообразието на бактериалното съобщество в интестиналния тракт на *C. aspersum* в зависимост от жизнения цикъл.

За постигане на целта са поставени следните задачи за изпълнение:

1. Характеристика на бактериалното разнообразие на интестиналната микрофлора в зависимост от жизнения цикъл чрез метода ARDRA
2. Динамика на култивируемата компонента на бактериалното съобщество в интестиналния тракт на *C. aspersum* в зависимост от жизнения цикъл
3. Изолиране, характеристика и идентификация на бактериалната микрофлора в интестиналния тракт на *C. aspersum*
 - 3.1. Изолиране на бактериална микрофлора от интестиналния тракт
 - 3.2. Фенотипна характеристика и идентификация на изолатите
 - 3.2.1. Морфологична характеристика на изолатите
 - 3.2.2. Биохимична характеристика на изолатите
 - 3.3. Молекулна характеристика и идентификация на изолираните щамове
 - 3.3.1. Диференциация на щамовете чрез PCR амплификация на интергенните участъци 16S-23S в рибозомалния оперон
 - 3.3.2. Групиране на изолатите чрез рестрикционен анализ на участък от рибозомалния оперон
 - 3.3.3. Рестрикционен анализ на 16S рДНК
 - 3.3.4. Идентификация чрез PCR амплификация с родово специфични праймери
 - 3.3.5. Характеристика и идентификация чрез PCR амплификация с групово специфични праймери
 - 3.3.6. Идентификация чрез PCR амплификация с видово специфични праймери
 - 3.3.7. Секвениране на избрани изолати
4. Метагеномен анализ на микробното разнообразие в гастроинтестиналния тракт на *C. aspersum*

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Произход на пробите

Изолиране на бактерии от интестиналния тракт на охлюви

Подготовка на пробите за микробиологична работа

Изолиране на бактерии от тракта на *S. aspersum*

Хранителни среди и условия на култивиране

Изолиране на култури от Грам-положителни и Грам-отрицателни бактерии

Проверка на чистотата на селектираните изолати

Характеристика и идентификация на изолатите

Фенотипна идентификация

Полимикротест 20E

API тестове

Ферментация на захари

Амилолитична активност

Способност за хидролиза на целулоза

Антибактериална активност

Генотипна идентификация

Изолиране на ДНК

PCR - амплификация на ITS фрагментите на 16S - 23S рДНК

PCR амплификация с родово специфични праймери

Мултиплекс и видово специфичен PCR

PCR-амплификация с праймери tRNA^{ala} - 23S/10

PCR - амплификация на 16S рДНК

RFLP-анализ на фрагменти от интергенните участъци и на 16S рДНК

ARDRA анализ

Секвениране

Метагеномен анализ

Амплификация на гена за 16S рДНК

Клониране на амплифицираната 16S рДНК, идентификация на коректни клонове и конструиране на клонови библиотеки

Рестрикционен анализ на клоновата библиотека

Изолиране на плазмидна ДНК и секвениране

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

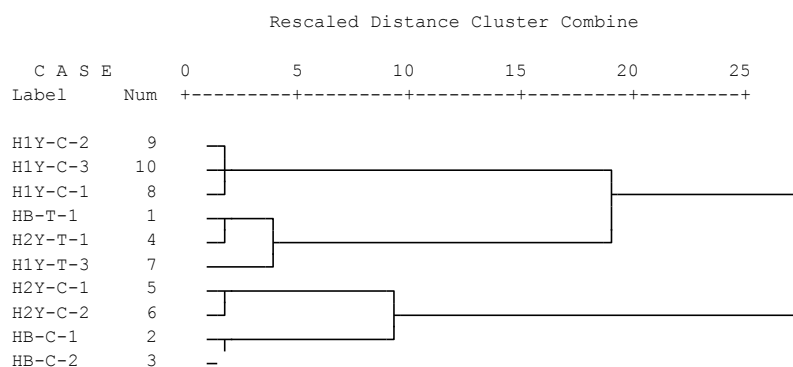
1. Характеристика на бактериалното разнообразие на интестиналната микрофлора в зависимост от жизнения цикъл чрез ARDRA анализ

За да се проследи настъпването на промени в микробното разнообразие при новоизлюпени охлюви от вида *C. aspersum*, активно хранещи се и в период на аестивация е приложен методът ARDRA. Използвана е тотална ДНК, изолирана по два начина. В първия начин съдържимо на интестиналния тракт на охлювите, намиращи се в съответните периоди от своето развитие, е култивирано в среди МПБ (за развитие на сапрофитни бактерии) и MRS (за развитие на млечнокиселата микрофлора), след което е изолирана ДНК от смесването на двете културални среди. Тази ДНК означаваме като култивируемата компонента (С-ДНК) на микрофлората на храносмилателния тракт на охлювите. Такава ДНК е изолирана от три новоизлюпени охлюви, два – в период на активно хранене и три – в период на аестивация. При другия начин, ДНК е изолирана директно от чревното съдържимо и представлява както култивируемата, така и некултивируемата компонента на микробното съобщество. Тази ДНК означаваме като тотална (Т-ДНК). Двата типа ДНК-и са амплифицирани с универсалните за 16S рДНК праймери 27F и 1492R. Получените PCR продукти са подложени на рестрикционен анализ с шест ендонуклеази (*Csp6I*, *Hin6I*, *TaqI*, *TasI*, *Tru1I* и *Hin6I*). Рестрикцията с ендонуклеазите *TaqI*, *TasI*, *Tru1I* и *Hin6I* не е достатъчно дискриминативна, поради получените сходни рестрикционни профили при анализ и на двата типа ДНК. Останалите две ендонуклеази, *Csp6I* и *Hin6I*, формират различни рестрикционни 16S рДНК профили, съставени от 4 до 12 фрагмента. Тези две рестриктази разпознават различни сайтове в 16S рДНК и разграничават култивируемата и некултивируемата компонента.

Рестрикционните профили от ARDRA анализа с ендонуклеаза *Csp6I* се групират в 5 основни групи при 96% подобие (Фиг. 1).

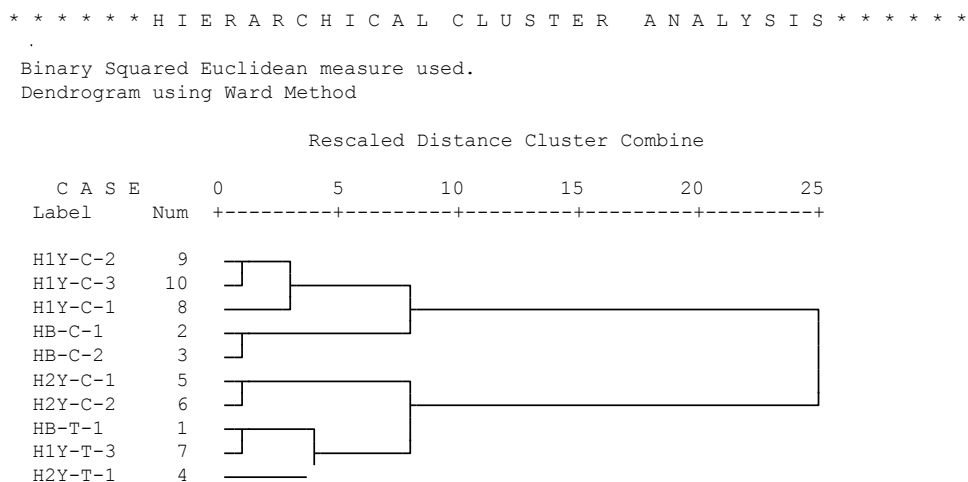
* * * * * H I E R A R C H I C A L C L U S T E R A N A L Y S I S * * * * *

Binary Squared Euclidean measure used.
Dendrogram using Ward Method



Фиг. 1 Дендрограма на базата на получените рестрикционни профили с ендонуклеаза *CspBI*.

Рестрикционният анализ с ендонуклеаза *HinfI* (фиг. 2) формира 6 основни групи, които показват значими различия в състава на микробното съобщество през различните етапи от жизнения цикъл на охлювите.



Фиг. 2 Дендрограма, построена на базата на получените рестрикционни профили с ендонуклеаза *HinfI*

ARDRA анализът с ендонуклеазите *HinfI* и *Csp6I*, както и йерархичният кластерен анализ показват, че съставът на микробното съобщество в интестиналния тракт на *C. aspersum* се влияе от сезонната ритмика и отговаря с промяна в своя състав и структура. Това налага необходимостта от по-детайлно изучаване на динамиката и микробното разнообразие на интестиналната микрофлора на *C. aspersum* с два взаимно допълващи се подхода – култивационен и метагеномен.

2. Динамика на култивируемата компонента на бактериалното съобщество в интестиналния тракт на *C. aspersum*

Динамиката на култивируемата компонента на микробното съобщество в интестиналния тракт на охлювите от вида *C. aspersum* през различните етапи от жизнения цикъл е проследено чрез анализирането на четири проби, означени като HB, H2Y, H1Y и H, които съответстват на четирите етапа от техния жизнен цикъл - новоизлюпени, активен период, аестивация и хибернация, съответно.

Общото количество на култивируемите бактерии, населяващи интестиналния тракт на охлювите варира през различните етапи на жизнения цикъл, като то е

най-високо през активния период ($1.6 \cdot 10^9$ CFU/ml) (Табл. 1). Ако се проследи динамиката в общата численост на бактериите по време на жизнения цикъл ясно се вижда, че те са най-слабо представени в новоизлюпените охлюви и по време на хибернация, а след активния период броят им рязко спада (Табл. 1). Ниското съдържание на култивируеми микроорганизми в младите охлюви се дължи на тяхното хранене, при което като хранителен ресурс се използват само обвивките от яйцата. Възможно е микробното съобщество през този етап да се характеризира освен с ниска численост и с различна компонентна структура в сравнение с тази през другите етапи.

Във всеки етап от жизнения цикъл на *S. aspersum* присъстват ентеробактериите и млечнокиселите бактерии, като динамиката на тяхната численост се подчинява на едни и същи закономерности – нараства в активния период и по-рязко или по-плавно намалява в периода на аестивация и хибернация. По-равномерно намалява броят на млечнокиселите бактерии. Прави впечатление различният брой на ентеробактериите през активния период, в зависимост от хранителната среда, на която той е отчитан. На среда Mac Conkey 2 техният брой е с един порядък по-висок от този на среда Mac Conkey 3, което се дължи на по-малката селективност на първата, която позволява развитието и на хомоферментативни млечнокисели ентерококи.

Табл. 1 Динамика на бактериалното същество в храносмилателния тракт на *S. aspersum* в зависимост от жизнения цикъл.

Среда	Група бактерии	Физиологично състояние на охлювите / брой бактерии. ml ⁻¹			
		НВ	Н2У	Н1У	Н
PCA	Общ брой	5.3.10 ⁵	1.6.10 ⁹	5.0.10 ⁶	6.5.10 ⁵
Mac Conkey	Ентеробактерии	1.4.10 ⁵	3.2.10 ⁶	2.0.10 ⁵	4.0.10 ⁵
Mac Conkey 2	Ентеробактерии и ентерококи	2.1.10 ⁵	1.1.10 ⁷	1.2.10 ⁵	1.0.10 ⁵
Mac Conkey 3	Ентеробактерии	1.8.10 ⁵	8.0.10 ⁶	1.2.10 ⁵	2.0.10 ⁵
MRS	Млечнокисели	5.6.10 ⁵	2.1.10 ⁷	5.9.10 ⁶	3.7.10 ⁵
M17	Млечнокисели	2.4.10 ⁵	9.0.10 ⁷	1.8.10 ⁶	3.2.10 ⁵
SS agar	<i>Salmonella</i> и <i>Shigella</i> * и др. ентеробактерии	6.5.10 ⁵	3.0.10 ⁷	1.3.10 ⁷	1.7.10 ³
GSP	<i>Aeromonas</i> и <i>Pseudomonas</i>	9.3.10 ⁷ -	8.0.10 ⁶ -	1.0.10 ⁴ -	- -
SPS	<i>C. perfringens</i>	3.6.10 ⁴	3.4.10 ⁷	3.9.10 ⁵	-
Скорбелен агар	Амилолитични	1.0.10 ²	2.0.10 ⁷	1.0.10 ⁴	1.0.10 ⁵
Млечен агар	Протеолитични	-	1.9.10 ⁵	-	-
Среда с целулоза	Целулозоразлагащи	-	1.3.10 ⁶	2.5.10 ⁴	4.5.10 ³

Легенда: (-) не е открит растеж; НВ- новоизлюпени охлюви; Н2У – активно хранещи се; Н1У – в аестивация; Н – в хибернация

*Представители на рофове *Salmonella* и *Shigella* не бяха установени

Пробите от различните етапи от развитието на охлювите са анализирани и за наличие на представители на родовете *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Aeromonas*, *Pseudomonas* и *C. perfringens*. Върху използваните различни варианти на среда Mac Conkey не са открити колонии, притежаващи специфичната морфология на колонииите на *E. coli*. Анализът на колонииите, развили се върху среда GSP показва, че най-голям брой колонии с характерната морфология за представители на род *Aeromonas* (жълти колонии с жълти ореоли) са открити в новоизлюпени охлюви - 9.3.10⁷ CFU/ml. Прави впечатление, че с напредване на жизнения цикъл, техният брой намалява до изчезване по време на хибернация. Върху средата, на която се развиват представителите на род *Aeromonas*, бактериите от род *Pseudomonas* се развиват като синьо-виолетови колонии с

червена зона. Такива колонии не бяха установени като постоянен култивируем компонент на чревната микрофлора на *C. aspersum*.

На хранителна среда (SS agar) за доказване на представители на род *Salmonella* и *Shigella* не бяха установени типичните за двата рода колонии – черно пигментирани и безцветни колонии. Наблюдавахме развитие на колонии с различна морфология (с червен ореол), чиито брой нараства значително в активния период и по време на аестивация и рязко спада (с три порядъка) по време на хибернация (Табл. 1). На този етап от нашите изследвания ние не сме характеризирали таксономично тези бактерии, но твърде вероятно е те да са други представители на сем. *Enterobacteriaceae*.

На среда SPS е установено присъствие на анаеробни бактерии, които формират вретеновидни безцветни колонии, но не притежаващи типичната за *C. perfringens* морфология. И тези бактерии са представени количествено най-добре по време на активния период, след което броят им намалява и изчезват.

Динамиката на амилолитичните, протеолитичните и целулозоразлагащите бактерии е различна. Единствено амилолитичните бактерии присъстват през целия жизнен цикъл, като броят им, а вероятно и тяхната активност са най-високи в активния период, което е логично. В новоизлюпените охлюви не се установяват както протеолитични, така и целулозоразлагащи бактерии. В активния период тези две групи са най-многобройни, като броят на целулозоразлагащите намалява през следващите етапи. Протеолитични бактерии не бяха открити както по време на аестивация, така и по време на хибернация.

Преди хибернация охлювите натрупват като резервни вещества гликоген и липиди, които са необходими за преживяване на ниските температури. Този факт може да обясни нарастването на числеността на популациите на амилолитичните бактерии, които най-вероятно също използват тези резервни вещества. Значителното развитие на целулозоразлагащи бактерии по време на активния период би могло да бъде обяснено с голямото количество и достъпност на хранителен ресурс, а преминаването в аестивация и хибернация има за последствие намаляване на екзогенния източник на целулоза и е съпроводено с намаляване на плътността на популациите на тези бактерии. Липсата на целулозоразлагащи бактерии в млада възраст също е свързана с начина на хранене, тъй като през този период охлювите не се хранят с растителна храна.

3. Изолиране, характеристика и идентификация на бактерии от интестиналния тракт на охлюви *C. aspersum*

3.1. Изолиране на Грам-отрицателни бактерии

Колониите развили се върху среди Mac Conkey, Mac Conkey 2, Mac Conkey 3, SS агар, GSP, които са предназначени за развитие на Грам-отрицателни бактерии са анализирани морфологично и разпределени по типове. Принадлежността по Грам е определена чрез диференциращо оцветяване. Представители от всички морфологични типове, оцветяващи се отрицателно по Грам са изолирани.

3.2. Фенотипна характеристика на Грам-отрицателните изолати

3.2.1. Морфологична характеристика

Колониите са диференцирани в 15 морфологични типове. Преобладават такива с хомогенна до зърнеста структура, с издут, кратеровиден, плосък до капковиден профил, с гладък и вълнист (до ризоиден) край и цвят вариращ от бял до различни нюанси на кремаво. Освен макроморфологията е определена и морфологията на съставлящите ги клетки. Клетките са с пръчковидна или сферична форма с различна големина, при някои култури се наблюдават филаменти. От всеки морфологичен тип са подбрани по няколко изолата, които са пречистени до чисти бактериални култури. Изолирани са 63 щама.

3.2.2. Биохимична характеристика

Всички изолати от Грам-отрицателни бактерии са физиолого-биохимично характеризирани чрез Полимикротест 20Е (Бул Био-НЦЗПБ ЕООД).

Тестът за индол показва способността на микроорганизмите да конвертират триптофан до индол, благодарение на редица вътреклетъчни ензими, които формират система – триптофаназа. Положителни по този признак са само дванадесет щама (19,04%), докато преобладаващата част от щамовете (80.95%) са отрицателни. Положителните щамове се разпределят неравномерно в различните етапи от жизнения цикъл на охлювите. През периодите на аестивация и хибернация процентът на положителните щамове е приблизително еднакъв -

7.93% и 9,56%, съответно. През активния период само един от щамовете (1,58%) формира индол от триптофан. Неравномерно се разпределят и отрицателните по този признак щамове. Най-голям дял те имат по време на аестивация (42.85%), а най-нисък по време на хибернация (25.39%).

Продуцирането на 2,3–бутандиол като продукт от ферментацията на глюкоза е ключов субстрат при идентификацията на Грам-отрицателните бактерии. Поради това, че продуктът се доказва трудно, за положителен резултат се счита наличието на ацетоин – междинен метаболит от дългия ферментационен път, който се идентифицира в реакцията на Voges – Proskauer (VP). В популацията на изолираните Грам-отрицателни бактерии преобладават положителните по този признак – 90,47% (57 изолата), 6,34% са отрицателни, а останалите два щамове не показват ясна реакция, поради което са кодирани от нас с 0.5. Почти всички щамове, изолирани по време на аестивация (30 щамове) са положителни, което представлява 47.61% от общия им брой. Подобна е характеристиката на щамовете по този признак и в останалите две проби от охлюви, взети през активния период (всички щамове са положителни) и по време на хибернация.

По отношение на способността да ферментират глюкоза, всички щамове, независимо през кой период от жизнения цикъл на охлювите са изолирани, с изключение на един, са положителни.

Способност на изолираните щамове да редуцират нитрати чрез продуциране на ензима нитратредуктаза е установена при 49 (77.77%) от всички щамове. Като отрицателни са определени само 5 изолата (7.93%), а като такива с неопределена реакция – 9 щамове (14.28). Всички щамове, изолирани от охлюви в активно период са положителни (или 14.28% от всички положителни).

Преобладаващата част (93.65%) от изследваните изолати са отрицателни по отношение на образуването на серводород. През всеки период от жизнения цикъл на охлювите обаче се откриват както отрицателни, така и положителни по този признак щамове.

По отношение на уреазна активност само три щамове (4.76%) са положителни, изолирани по време на аестивация и хибернация. През активния период (проба H2Y) не се откриват уреазно-положителни щамове.

При декарбоксилирането на лизина се получава кадаверин. За протичането на тази метаболитна реакция микроорганизмите трябва да продуцират ензима L-лизин декарбоксилаза. По-голямата част от изолатите (77.77%) са отрицателни по

този признак. Разпределението на щамовете е различно през различните периоди, но през всички има както отрицателни, така и положителни.

Декарбоксилирането на орнитина води до получаване на путресцин. Със способност да извършват тази реакция, т.е. такива, които имат ензима L-орнитин декарбоксилаза са 14 щама (22.22%), докато останалите са отрицателни. Както положителни, така и отрицателни се срещат във всяка от изследваните проби, съответстващи на различни периоди от жизнения цикъл на охлювите.

Подобен е процентът на L-аргинин дихидролаза отрицателните щамове (79.365), т.е. те преобладават, като само през активния период не се откриват и положителни по тази характеристика.

Нито един от щамовете не притежава ензима L-фенилаланин дезаминаза, който деаминира фенилаланина с продукцията на фенилпируват. Този резултат показва, че изолираните от тракта на охлювите микроорганизми не могат да използват аминокиселината фенилаланин като въглероден източник.

Натриев малонат се използва от 32 (50.79%) от изследваните щамове. Броят на положителните и отрицателните щамове е различен през различните периоди, през които преминават охлювите в своето развитие.

Само 12 изолата (19.04%) от всички щамове могат да усвояват захарозата като източник на въглерод. По време на активния период (проба H2Y) липсват положителни по усвояването на този субстрат щамове.

Манитът се усвоява от 33.33% от щамовете, като те се откриват както през аестивация, така и през хибернация. Всички щамове, изолирани по време на активния период показват колеблива реакция.

Адонитът и мезо-инозитът са субстрати, които се усвояват само от по 5 щама (7.93%), които са изолирани и през трите етапа от жизнения цикъл на охлювите.

Трудно се усвоява и сорбитът. Процентът на положителните щамове е (20.63%) и те се срещат през всеки от изследваните периоди.

L-арабинозата не се усвоява като източник на въглерод от нито един от изолатите от всички изследвани проби, а L-рамнозата - от 4 щама (6.34%). Прави впечатление, че положителните щамове напълно изместват отрицателните по време на хибернация.

Могат да хидролизират ескулин преобладаващата част от щамовете (93.65%). Подобно на L-рамнозата и тук, по време на хибернация (проба H) не се срещат отрицателни щамове по този признак.

Ясно изразена способност към използване на лактозата като въглероден източник показват малко над половината от щамовете (50.79%). Голям е процентът на изолатите, за които този признак не може да бъде определен нито като положителен, нито като отрицателен (41.26%).

За усвояването на лактозата бактериите трябва да притежават няколко ензима, един от които е β -галактозидаза. За определянето на този признак като субстрат се използва орто-нитрофенил- β -D-галактопиранозид (ONPG), който е аналог на лактозата и в присъствието на ензима се разпада до жълт продукт – орто-нитро-фенол. Повече от половината от щамовете притежават този ензим, което до голяма степен съответства на резултатите за усвояването на лактоза. По време на активния период, както и през хибернацията всички щамове са положителни по отношение синтеза на β -галактозидаза.

Резултатите от биохимичната характеристика на щамовете показват, че всички щамове, с изключение на един са ферментиращи Грам-отрицателни бактерии, които не притежават ензима L-фенилаланин дезаминаза и не могат да усвояват L-арабиноза. По останалите признаци щамовете се различават помежду си, независимо през кой жизнен период са изолирани.

3.3. Молекулна характеристика и идентификация на Грам-отрицателните бактериални изолати

За диференцирането на видовете са използвани следните техники: PCR амплификация на 16S-23S ITS рДНК, рестрикционен анализ на амплифициран фрагмент от ITS-23S рДНК с ендонуклеази (*Hinf*I и *Taq*I) и рестрикционен анализ с *Taq*I на амплифициран фрагмент от 16S рДНК за разграничаване на изолати с еднакъв рестрикционен профил на ITS-23S рДНК, но с различна видова принадлежност, доказана чрез секвениране.

3.3.1. Диференциране на щамовете чрез PCR амплификация на 16S/23S рДНК интергенни участъци в рибозомалния оперон

ДНК изолирана от всички Грам-отрицателни изолати (63 щама) е подложена на PCR-амплификация с универсалните праймери 16S/2 и 23S/10. Получените амплификационни продукти са групирани в седем основни ITS-профили, които се базират на полиморфизма в техните спейсърните участъци в рибозомалния

оперон (дължина и брой на фрагментите). Това начално диференциране на изолатите предполага наличие поне на седем родови групи в изследваното микробно съобщество. Резултатите са представени на Табл.2, в която щамовете са разпределени на базата на своя ITS-профил и в зависимост от периода от жизнения цикъл на охлювите, от които те са изолирани. Анализът на ITS-профилите показва, че те се групират на такива с един (ITS-1), с два (ITS-2, ITS-3, ITS-4) и три фрагмента (ITS-5, ITS-6 и ITS-7) с различна дължина. Профилите с три амплификационни продукти се различават по дължината на най-дългия фрагмент (Фиг. 5).

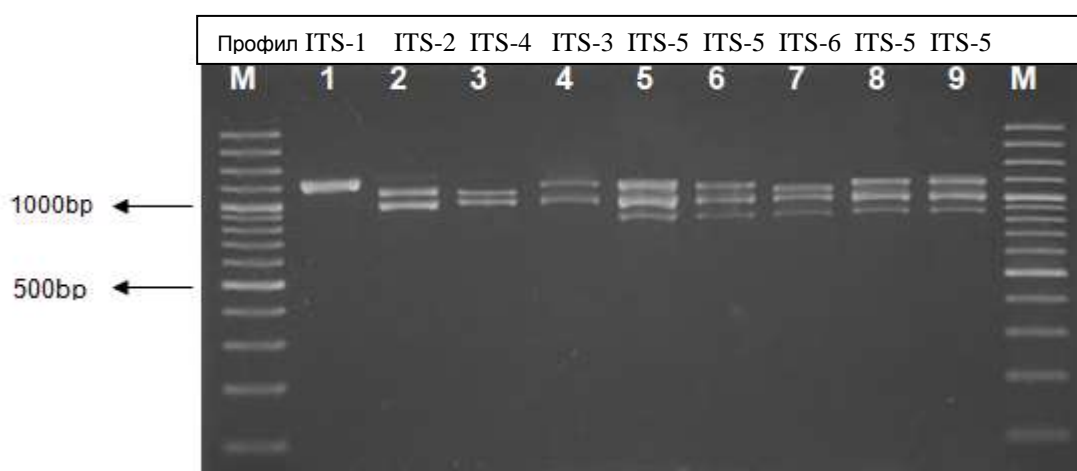
Табл. 2 Профили на изолатите Грам-отрицателни бактерии след амплификация на спейсърния участък между 16S/23S рДНК в рибозомалния оперон.

ITS-профил	Дължина на фрагментите, bp	Щамове		
		Активно състояние (H2Y)	Аестивация (H1Y)	Хибернация (H)
ITS-1	1230	-	H1Y- 1cK (1)	-
ITS-2	1000,1140	-	H1Y-3cK, H1Y-4cK (2)	-
ITS-3	1040,1225	-	H1Y-12K (1)	-
ITS- 4	1035,1135	-	H1Y-2K, H1Y-7K (2)	-
ITS-5	850, 1000, 1200	H2Y-1K, H2Y-2K, H2Y-3K, H2Y-4K, H2Y-6K, H2Y-7K, H2Y-10K, H2Y-11K (8)	H1Y-3K, H1Y-4K, H1Y-5K, H1Y-8K, H1Y-10K, H1Y-13K, H1Y-14K, H1Y-15K, H1Y-17K, H1Y-18K, H1Y-20K, H1Y-21K, H1Y-22K, H1Y-23K, H1Y-24K, H1Y-25K, H1Y-28K, H1Y-31K, H1Y-32K, H1Y-2CK, H1Y-5CK (21)	H1K, H2K, H3K, H11K, H12K, H13K, H14K, H25K, H26K, H29K, H30K, H31K, H32K, H34K, H35K, H36K (16)
ITS- 6	850, 1000, 1100	H2Y-9K (1)	H1Y -11K, H1Y-16K, H1Y-29K, H1Y-30K (4)	H4K, H7K, H8K, H9K, H10K, H27K (6)
ITS- 7	850,1000, 1050	-	H1Y-19K (1)	-

От Табл. 2 се вижда, че най-масов е профил ITS-5, който обединява повече от половината от изолатите (71.4%), от които 46.7% са изолирани от охлюви в период на аестивация. Вторият по численост е профилът ITS-6 – 17.5% от щамовете имат такъв профил. Тези два профила се срещат почти през целия жизнен цикъл на охлювите, което по всяка вероятност се дължи на доминиращото им значение за протичане на жизнените процеси, независимо от фазата на

развитие на охлювите. Останалите пет ITS-профили са характерни за единични щамове, изолирани от охлюви в период на аестивация. Прави впечатление, че в пробите от аестивация се срещат и седемте ITS профили, установени в настоящото изследване. Най-голямото микробното разнообразие през този период може да се обясни с промяна в условията на средата водеща до намаляване количеството на доминиращите популации и възможност за изолиране на повече микробни видове.

Различните ITS-профили на избрани изолати са показани на Фиг. 3.



Фиг.3 PCR-амплификация с праймери 16S/2 и 23S/10 на избрани щамове Грам-отрицателни бактерии, изолирани от охлюви в активен период и аестивация. 1 – Н1У-1сК; 2 – Н1У-3сК; 3 – Н1У-2К; 4 – Н1У-12К; 5 – Н1У-14К; 6 – Н1У-24К; 7 – Н1У-30К; 8 – Н1У-31К; 9 – Н2У-4К; М – ДНК маркер (100bp).

Установяването на пет специфични само за аестивация профили (ITS-1, ITS-2, ITS-3, ITS-4 и ITS-7) предполага, че това са видове, осъществяващи важни функции през този период от жизнения цикъл на охлювите. Бактериалното разнообразие в активния период (Н2У) и по време на хибернация (Н) е доста по-скромно и е представено от два профила – ITS-5 и ITS-6. Макар, количествено бактериите да са най-много през активния период, то очевидно този висок брой е за сметка на по-малко родове и/или видове, които обаче са количествено доминиращи и имат съществена роля. От друга страна тези два профила присъстват в микробното съобщество, независимо от периода от жизнения цикъл на охлювите. Това показва, че те са устойчиви видове, които могат успешно да преживеят неблагоприятните условия на аестивация и хибернация и са постоянна

компонента на микробното съобщество през целия жизнен цикъл на охлювите, което предполага съществена роля във функционирането на храносмилателния им тракт. Получените резултати показват, че Грам-отрицателната чревна микрофлора претърпява значителни количествени и качествени изменения в зависимост от жизнения цикъл на *C. aspersum*.

3.3.2. Диференциране на щамовете чрез рестрикционен анализ на участък от рибозомалния оперон

Получените ITS-профили дават обща представа за молекулната характеристика на чревната микрофлора и чрез тях се осъществява диференциране, но на по-висок таксономичен ранг. За тази цел ДНК на щамовете е амплифицирана с двойката праймери tRNA^{ala}/23S-10, което има за резултат формирането на продукт при всички щамове, които имат гена за tRNA^{ala} в ITS участъка между 16S и 23S гените. Всички изолати, с изключение на един (H1Y-1сК) - в който липсва tRNA^{ala} в ITS участъка, дават положителен резултат. Получените амплификационни продукти (с дължина 800 bp) са подложени на рестрикция с рестриктази *Hinf*I и *Taq*I. Анализът е проведен с щамовете, изолирани през активния период, по време на аестивация и хибернация.

3.3.2.1. Рестрикционен анализ с *Hinf* I

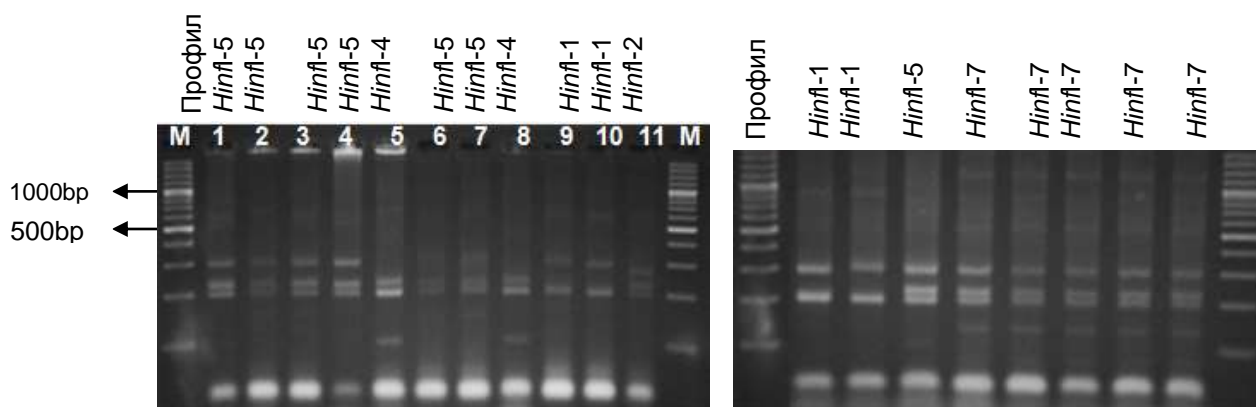
Рестрикционният анализ с ендонуклеаза *Hinf*I е проведен с всички изолати (62 щама), които дават положителен резултат при PCR-амплификацията с двойката праймери tRNA^{ala}/23S-10. Като резултат от този анализ щамовете формират 10 рестрикционни профила (Табл.3 и фиг. 4).

При сравняването на резултатите от PCR амплификацията на интергенните участъци с тези от рестрикционния анализ се вижда, че най-масовата група - ITS-5, се описва с четири различни *Hinf*I-профили – *Hinf*I-4, *Hinf*I-5, *Hinf*I-6 и *Hinf*I-7, което показва голямо вътрешно разнообразие в групата. Последният профил се среща само в тази ITS-група и е характерен за пет щама, изолирани от охлюви в хибернация. Още по-голямо е разнообразието в следващата по големина ITS-група – ITS-6. Тя е представена от шест *Hinf*I-профили - *Hinf*I-1, *Hinf*I-2, *Hinf*I-5, *Hinf*I-8, *Hinf*I-9 и *Hinf*I-10. Последните три профила не се откриват в останалите ITS-групи и са характерни само за единични щамове, изолирани по време на активно състояние и в период на аестивация.

Табл. 3 Рестрикционен анализ с *Hinf*I на участък от рибозомалния оперон изолираните щамове

Профил	Дължина на фрагментите, bp	Щамове		
		Активно състояние (H2Y)	Аестивация (H1Y)	Хибернация (H)
<i>Hinf</i> I-1	200, 300	-	-	H7K, H8K, H9K, H10K
<i>Hinf</i> I-2	200, 220, 280	-	H1Y-3cK	H4K, H27K
<i>Hinf</i> I-3	200, 220, 320	-	H1Y-2K	-
<i>Hinf</i> I-4	110, 200, 220	H2Y-1K, H2Y2K, H2Y-3K, H2Y4K, H2Y-6K, H2Y-7K	H1Y-31K, H1Y-32K, H1Y-2cK	H25K, H26K;
<i>Hinf</i> I-5	200, 220, 300	H2Y-10K, H2Y-11K	H1Y-3K, H1Y-4K, H1Y-7K, H1Y-8K, H1Y-10K, H1Y-12K, H1Y-13K, H1Y-14K, H1Y-15K, H1Y-17K, H1Y-18K, H1Y-21K, H1Y-22K, H1Y-23K, H1Y-24K, H1Y-25K, H1Y-28K, H1Y-29K, H1Y-30K, H1Y-4cK, H1Y-5cK	H1K, H2K, H3K, H14, H29K, H30K, H34K, H35K
<i>Hinf</i> I-6	70, 200, 220	-	H1Y-5K, H1Y-19K, H1Y-20K	H32
<i>Hinf</i> I-7	150, 200, 220, 300	-	-	H11K, H12K, H13K, H31K, H36K
<i>Hinf</i> I-8	200, 220, 280, 300	-	H1Y-11K	-
<i>Hinf</i> I-9	100, 200, 220, 280, 300	-	H1Y-16K	-
<i>Hinf</i> I-10	100, 180, 200, 220, 380, 480	H2Y-9K	-	-

Прави впечатление, че профилът *Hinf*I-5 се среща в пет от установените седем ITS-групи и характеризира щамове, изолирани и през трите изследвани периоди – активно състояние, аестивация и хибернация. Профилите *Hinf*I-2 и *Hinf*I-6 се среща в две ITS групи. На този етап на изследването не може да се даде някакво обяснение на наблюдаваното, но би могло да се предположи, че в профилите *Hinf*I-5, *Hinf*I-2 и *Hinf*I-6 попадат щамове, които независимо от различната си ITS принадлежност имат еднакви сайтове за разпознаване от тази ендонуклеаза и вероятно са близко родствени.



Фиг.4 Рестрикционен анализ с ензим *Hinfl* на щамове, изолирани от охлюви в хибернация (H).

1 – H1K; 2 – H2K; 3 – H3K; 4 – H34K; 5 – H26K; 6 – H29K; 7 – H30K; 8 – H25K; 9 – H8K; 10 – H10K; 11 – H4K; 12 – H9K; 13 – H7K; 14 – H35K; 15 – H31K; 16 – H11K; 17 – H13K; 18 – H36K; 19 – H12K; M – ДНК маркер (100 bp).

Анализът на рестрикционните профили, получени с ензима *Hinfl* показва, че част от щамовете групирани в определен ITS профил са генетично различни тъй като формират различни *Hinfl* профили. Това предполага и различна видова принадлежност.

3.3.2.2. Рестрикционен анализ с ендонуклеаза *TaqI*

За да се извърши по-точно разделяне, всички щамове са подложени на втори рестрикционен анализ с ензим *TaqI*. Резултатите показват, че изследваните щамове формират 17 *TaqI* профила (Табл.4), в които попадат различен брой изолати от изследваните проби.

Профилите се различават по броя и дължината на формиращите ги фрагменти (Табл.4 и Фиг.5).

Табл. 4 Рестрикционен анализ с *TaqI* на участък от рибозомалния оперон изолираните щамове

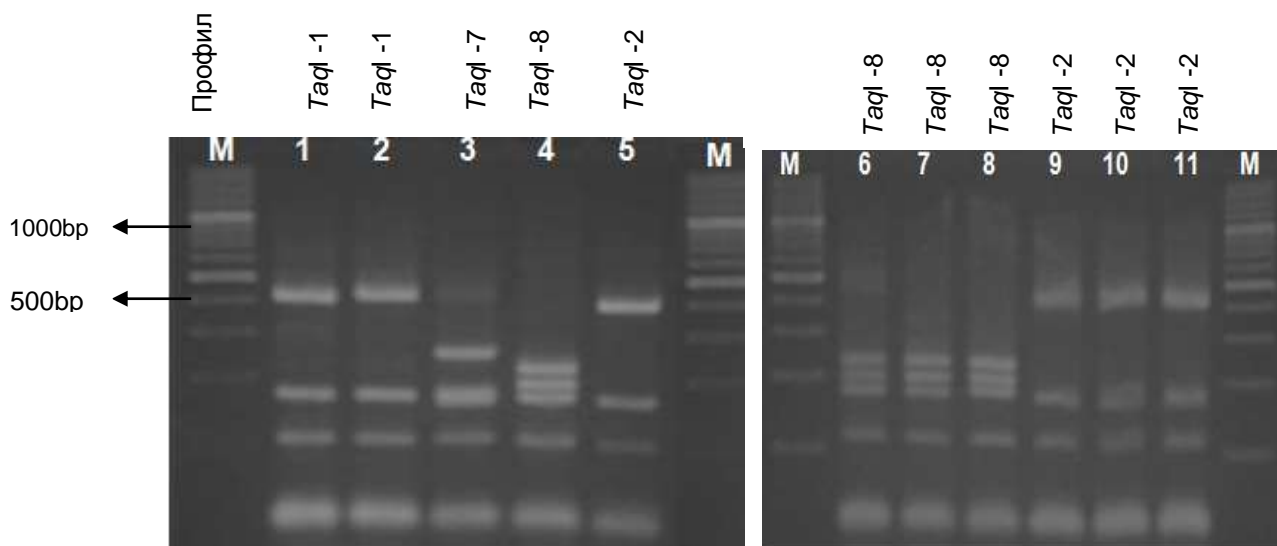
Профил	Дължина на фрагментите, bp	Щамове		
		Активно състояние (H2Y)	Аестивация (H1Y)	Хибернация (H)
<i>TaqI</i> -1	110, 180, 420	-	H1Y-3cK, H1Y-2K	H2K, H3K, H29K, H30K, H34K
<i>TaqI</i> - 2	110, 180, 400	H2Y-3K H2Y-4K	H1Y-14K, H1Y-31K	-
<i>TaqI</i> -3	110, 180, 280	-	-	H11K, H12K, H13K, H31K, H36K
<i>TaqI</i> -4	110, 150, 420	-	-	H7K, H8K, H9K, H10K
<i>TaqI</i> - 5	110, 180, 450, 700	-	-	H25K, H26K
<i>TaqI</i> - 6	110, 180, 220, 400	-	-	H4K
<i>TaqI</i> - 7	110, 180, 200, 250	-	H1Y-12K;	-
<i>TaqI</i> - 8	110, 180, 200, 220	H2Y-11K	H1Y-13K, H1Y-21K, H1Y-22K, H1Y-23K, H1Y-24K, H1Y-25K, H1Y-29K, H1Y-30K, H1Y-5cK;	-
<i>TaqI</i> - 9	110, 180, 220, 450	H2Y-1K, H2Y-2K, H2Y-6K, H2Y-7K	H1Y-3K, H1Y-4K, H1Y-7K, H1Y-8K, H1Y-10K, H1Y-15K, H1Y-17K, H1Y-18K, H1Y-28K, H1Y-32K, H1Y-2cK	-
<i>TaqI</i> - 10	110, 180, 220, 380	-	H1Y-5K, H1Y-20K	-
<i>TaqI</i> - 11	110, 180, 220, 400, 420	-	-	H35K
<i>TaqI</i> - 12	110, 180, 220, 380, 420	-	H1Y-11K, H1Y-16K	H1K, H14K, H32K
<i>TaqI</i> - 13	110, 180, 220, 380, 450	H2Y-10K	-	-
<i>TaqI</i> - 14	110, 150, 180, 220, 350, 400	-	-	H27K
<i>TaqI</i> - 15	110,180,250, 280, 380, 460, 470	-	H1Y-4cK	-
<i>TaqI</i> - 16	110, 180, 200, 220, 380, 400, 750;	-	H1Y-19K	-
<i>TaqI</i> - 17	110, 180, 190, 200, 220, 350, 360, 600	H2Y-9K	-	-

При сравняването на резултатите от PCR амплификацията на интергенните участъци с тези от рестрикционния анализ с *TaqI* става ясно, че най-голямата, ITS-5 група, се разделя на десет *TaqI*- профили (от *TaqI*-1 до *TaqI*-3, *TaqI*-5, и от *TaqI*-8 до *TaqI*-13), докато чрез *HinfI* – на четири профила, което показва, че *TaqI* разкрива по-голямо вътрегрупово разнообразие. Останалите ITS-групи се

разделят на същия брой профили и с този ензим. При рестрикцията с *HinfI*, 31 от щамовете, групирани в различни ITS-групи (ITS-2, ITS-3, ITS-4, ITS-5 и ITS-6) показват профил *HinfI*-5. На базата на това ние направихме заключение, че това вероятно са щамове, принадлежащи към различни видове и/или родове, но имащи еднакви сайтове на рязане с тази ендонуклеаза. Това наше заключение се потвърди за по-голямата част от щамовете. Щамовете с *HinfI*-5 от ITS-5 се групират чрез *TaqI* в седем профили, обединяващи различен брой щамове – *TaqI*-9 (8 щама), *TaqI*-8 (7 щама), *TaqI*-1 (5 щама), *TaqI*-12 (2 щама), *TaqI*-2, *TaqI*-11, *TaqI*-13 и *TaqI*-15 (с по един щам). Щамовете притежаващи също *HinfI*-5, но групирани в ITS-2 и ITS-3 се диференцират един от друг като показват профили *TaqI*-15 и *TaqI*-7, съответно. По подобен начин щамовете, имащи *HinfI*-2 профил, но принадлежащи към различни ITS са диференцирани с *TaqI* в три различни групи – *TaqI*-1 (ITS-2), *TaqI*-6 (ITS-6) и *TaqI*-14 (ITS-6). Четирите щама с профил *HinfI*-6 от групи ITS-5 (три щама) и ITS-7 (един щам) са разграничени един от друг. Щамовете от ITS-5 се групират по следния начин – два с профил *TaqI*-10 и един с *TaqI*-12, докато щамът от ITS-7 има профил *TaqI*-16. Единадесетте щама с профил *HinfI*-4, характерен само за група ITS-5 също се различават помежду си, което се доказва след рестрикция с *TaqI*. Шест от тях притежават профил *TaqI*-9, три – профил *TaqI*-2 и два – *TaqI*-5. В същото време прави впечатление, че един и същи *TaqI*-профил притежават щамове от различни ITS-групи и имащи различен *HinfI*-профил. Щамове H2Y-1K, H2Y-2K, H2Y-6K, H2Y-7K, H1Y-32K и щам H1Y-2cK, които се отнасят към ITS-5 група и имат профил *HinfI*-4 формират един и същи *TaqI*-профил (*TaqI*-9) заедно с 9 щама, имащи *HinfI*-5 профил, един от които е от група ITS-4, а останалите – от ITS-5. Подобно, три щама от ITS-5, два от които с *HinfI*-5, а другият с *HinfI*-6 профил, както и два щама от ITS-6 група, притежаващи съответно *HinfI*-8 и *HinfI*-9 профили, формират един и същи *TaqI*-профил (*TaqI*-12). Същото важи за щамове, които формират *TaqI*-1 (H1Y-3cK- ITS-2 и *HinfI*-2; H1Y-2k – ITS-4 и *HinfI*-3; H2K, H3K, H29K, H30K, H34K – ITS-5 и *HinfI*-5) и *TaqI*-2 профил (H2Y-3K, H2Y-4K | H1Y-3K – ITS-5, *HinfI*-4 и H1Y-14K – ITS-5 и *HinfI*-5).

Рестрикционният анализ с *TaqI* позволява да се потвърди хомогенността на някои от получените с *HinfI* рестрикционни групи – *HinfI*-1 и *HinfI*-7, които са характерни само за ITS-6 и ITS-5 група, съответно. В същото време този ензим разкри хетерогенността сред щамовете с профили *HinfI*-2, *HinfI*-4, *HinfI*-5 и *HinfI*-6, с което се обяснява тяхното присъствие в повече от една ITS-група. В същото

време еднаквият *TaqI* - профил на щамове от различни ITS-групи и с различен *HinfI*-профил показва, че пълното диференциране на щамовете е възможно чрез използването и на други ендонуклеази.



Фиг 5. Профили след рестрикционен анализ с ензим *TaqI* на щамове, изолирани от охлюви в активно състояние (H2Y) и аестивация (H1Y).

1 – H1Y-3сК; 2 – H1Y-2К; 3 – H1Y-12К; 4 - H1Y-13К; 5 - H1Y-14К; 6 - H1Y-24К; 7 - H1Y-25К; 8 - H1Y-30К; 9 - H1Y-31К; 10 – H2Y-4К; 11 – H2Y-3К; М – ДНК маркер (100bp).

Молекулярното типичане на изолираните щамове от интестиналния тракт на охлювите показва, че в анализираната група има поне 17 различни бактериални видове, някои от които е възможно да принадлежат към един и същи или различни родове.

3.3.3. Секвениране на изолати от гастроинтестиналния тракт на *S. aspersum*

Избрани щамове, изолирани от охлюви в активно състояние, аестивация и хибернация, показали различни профили след амплифициране на спейсърния участък между 16S/23S рДНК в рибозомалния оперон и попадащи в различни групи след рестрикция с ензимите *HinfI* и *TaqI* са подложени на секвенционен анализ с цел да се установи таксономичния им статус. На секвениране са подложени 13 щама, даващи много ясен амплификационен сигнал с универсалните праймери 9F/1542R. Получените резултати са представени в Табл. 5.

Табл.5 Секвенционнионен анализ на избрани щамове, изолирани от охлюви *C. aspersum*

Щам	16S рДНК базирана идентификация	Хомоложност	Референтни видове
H1Y-1cK	<i>Acinetobacter oleivorans</i>	99%	ref NR_102814.1
H1Y-3cK	<i>E. kobei</i>	99%	ref NR_028993.1
H1Y-2K	<i>L. amnigena</i>	98%	ref NR_024642.1
H1Y-12K	<i>Pantoea sp.</i>	90%	KF202772.1
H1Y-14K	<i>B. agrestis</i>	98%	gb DQ223869.1
H2Y-3K	<i>B. agrestis</i>	97%	emb HF585059.1
H2Y-4K	<i>B. agrestis</i>	98%	emb HF585063.1
H1Y-31K	<i>B. agrestis</i>	85%	gb KF625190.1
H1Y-13K	<i>C. gillenii</i>	99%	ref NR_041697.1
H1Y-24K	<i>Raoultella planticola</i>	98%	ref NR_024996.1
H1Y-25K	<i>R. terrigena</i>	99%	dbj AB680714.1
H1Y-30K	<i>K. cryocrescens</i>	100%	ref NR_028803.1
H1Y-16K	<i>K. ascorbata</i>	99%	emb FN813249.1

Щам H1Y-1cK, изолиран от охлюви в период на aestivация (H1Y), има профил, характерен само за него и се отнася към ITS-1 група. Получената секвенция (1079 бази) отнася щама H1Y-1cK към род *Acinetobacter* и с най-голямо подобие (Табл.5) към вида *A. oleivorans* DR1.

Щамове H1Y-3cK и H1Y-2K са от различни ITS групи, притежават различни *HinfI*-профили, но имат един и същи *TaqI*-профил – *TaqI*-1. В резултат на секвенирането (Табл.5) първият щам се идентифицира с 99% сходство с вида *E. kobei*, докато вторият с 98% сходство към вида *E. amnigenus*, рекласифициран впоследствие на базата на мултилокусен сквенционен анализ към вида *L. amnigena* (Carrie et al., 2013), с което се обяснява принадлежността към различни ITS-групи, които обикновено групират щамовете на родово ниво. Този резултат показва, че дискриминираща стойност има ензимът *HinfI*, докато *TaqI* не може да диференцира двата вида, с което се потвърждава необходимостта от анализирането на щамовете с по-широк набор рестрикционни ензими. Изследван е потенциалът на вида *L. amnigena* да стимулира растежа при растенията (Marasco et al., 2013) и е установено, че той представлява част от епифитната микробиота на растенията, което обяснява присъствието му в интестиналния тракт на *C. aspersum*.

Щамът H1Y-12K формира самостоятелно профил ITS-3, който показва най-висок процент на сходство, макар и недостатъчен за видова идентификация - 90%

с *Pantoea* sp. LL48. Представителите на род *Pantoea* са установени като ендофитни бактерии в растението *Lavandula angustifolia* Miller и са разпространени и по други растителни видове, откъдето вероятно попадат в храносмилателния тракт на охлювите.

От ITS-5 профила, който обединява най-голям брой щамове за секвениране са подбрани 7 щамове. Три от тях (H2Y-3K, H2Y-4K, H1Y-31K) притежават и еднакъв *Hinf*I и *Taq*I – профили и заедно с щам H1Y-14K, който се различава от тях по своя *Hinf*I-профил се идентифицират като *B. agrestis*. Процентът на подобие с този вид за един от щамовете – H1Y-31K е обаче твърде нисък (Табл.5), за да го приемем като идентифициран. Резултатите показват, че видът *B. agrestis* се описва с два различни *Hinf*I-профили (*Hinf*I-5 и *Hinf*I-4). Получените от нас секвенции са сходни с публикуваните от Marasco et al., (2013). Установяването на вида *B. agrestis* е в корелация с данни от други автори, които също го откриват в гастроинтестиналния тракт на два вида охлюви – *H. pomatia* и *C. aspersum* и на риби (Charrier et al., 2006; Shakir et al., 2013).

Останалите три щамове H1Y-13K, H1Y-24K, H1Y-25K не се различават помежду си по *Hinf*I и *Taq*I-профили, но се идентифицират с висок процент на подобие към три различни вида, два от които са към един и същи род (Табл.5). Щам H1Y-13K се идентифицира като *C. gillenbergii*, а другите два щамове съответно към *R. planticola* с идентичност 98% към типовата култура *R. planticola* ATCC 33531 и *R. terrigena* с идентичност 99% към щам *R. terrigena* NBRC 14941. Някои от представителите на род *Raoultella* дълго време са били част от род *Klebsiella*, затова и първоначално името на вида е *K. planticola*, който през 2001 година е преименуван на *R. planticola*, (Drancourt et al., 2001). От получените резултати се вижда, че амплификацията по ITS-регионите групира в общ профил близкородствени неизвестни щамове.

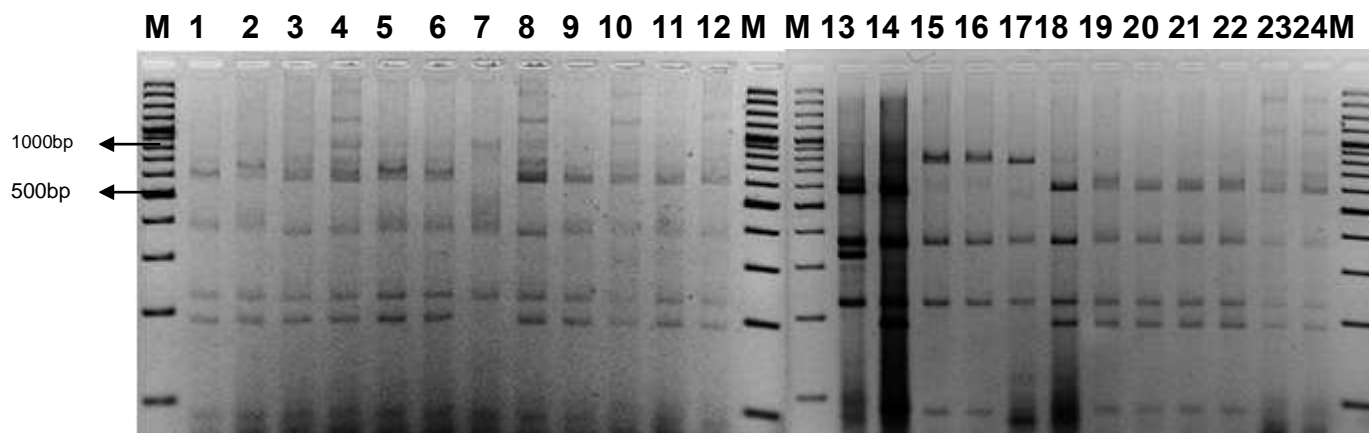
От ITS-6 група за секвениране са подбрани два щамове (H1Y-16K и H1Y-30K), които се различават по своите *Hinf*I и *Taq*I-профили. Секвенирането потвърди предполагаемата им принадлежност на базата на ITS амплификацията към един и същи род, но показва тяхното отнасяне към различни видове с висок процент на сходство. Секвенционната последователност на щам H1Y-30K е 100% идентична с тази на вида *Kluuyvera cryocrescens* ([ref|NR_028803.1|](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16880311/)), която е получена при изучаване на филогенетичните връзки в рамките на род *Kluuyvera* (Pavan et al., 2005). Щам H1Y-16K показва 99% сходство с вида *Kluuyvera ascorbata*

(emb|FN813249.1|). Публикуваната секвенция е получена при изучаване на производните на бета лактамази СТХ-М от Rodriguez (2010).

Сред секвенираните щамове доминират такива от сем. *Enterobacteriaceae* – *E. kobei*, *L. amnigena*, *Pantoea sp.*, *B. agrestis*, *C. gillenii*, *R. planticola*, *R. terrigena*, *K. cryocrescens* и *K. ascorbata*. От сем. *Moraxellaceae* е един от щамовете като вида *A. oleivorans*.

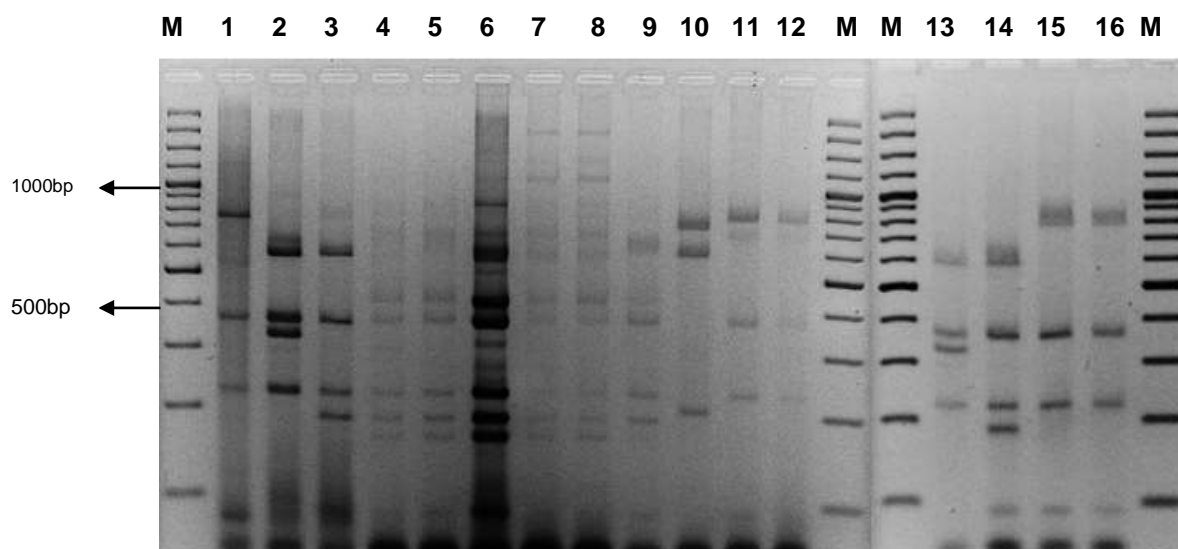
3.3.4. Рестрикционен анализ на 16S рДНК на избрани щамове

След рестрикцията на участък от 16S-23S ITS рДНК с ензимите *Hin*fl и *Taq*I и секвенционния анализ (Табл.5) се установи, че някои щамове с еднакви рестрикционни профили се отнасят към различни видове след секвенирането, което прави невъзможно прилагането на тези резултати към такива, които не са секвенирани. Ето защо е проведена PCR амплификация на 16S рДНК на избрани щамове с универсални праймери 9F/1542R и продуктът е подложен на рестрикция с ензим *Taq*I (Фиг. 6 и 7).



Фиг.6 Рестрикционен анализ на 16S рДНК с праймери 9F /1542R на щамове, изолирани от охлюви в активно състояние (H2Y), аестивация (H1Y) и хибернация (H) с ензима *Taq*I.

1 – H1K; 2 – H2K; 3 – H3K; 4 – H34K; 5 – H29K; 6 – H30K; 7 – H35K; 8 – H31K; 9 – H36K; 10 – H11K; 11 – H12K; 12 – H32K; 13 – H1Y-16K; 14 - H1Y-30K; 15 - H1Y-24K; 16 - H1Y-25K; 17 - H1Y-13K; 18 - H1Y-2K; 19 - H1Y-14K; 20 – H2Y-3K; 21 – H2Y-4K; 22 - H1Y-31K; 23 – H13K; 24 – H14K; M – ДНК маркер (100bp).



Фиг.7 Рестрикционен анализ на 16S рДНК с праймери 9F/1542R на щамове, изолирани от охлюви в активно състояние (Н2У), аестивация (Н1У) и хибернация (Н) с ензима *TaqI*: 1 – Н1У-13К; 2 - Н1У-16К; 3 - Н1У-2К; 4 – Н7К; 5 – Н8К; 6 – Н9К; 7 – Н10К; 8 – Н27К; 9 – Н4К; 10 – Н20К; 11 – Н25К; 12 – Н26К; 13 - Н1У-16К; 14 - Н1У-30К; 15 - Н1У-24К; 16 - Н1У-25К; М – ДНК маркер (100bp).

Щамовете Н1У-16К и Н1У-30К са от една и съща ITS група, но имат различни *HinfI* и *TaqI*-профили на ITS-23S участъка на рДНК. С първия ензим Н1У-30К показва еднакъв профил (*HinfI*-5) с щамове, идентифицирани след секвениране към родовете *Buttiauxella*, *Citrobacter* и *Raoultella* (Табл.5), а с втория ензим – профил (*TaqI*-8), какъвто притежават родовете *Citrobacter* и *Raoultella*. Щам Н1У-16 се отделя, формирайки самостоятелни профили и с двата ензима (*HinfI*-9 и *TaqI*-12). Допълнителният рестрикционен анализ на 16S рДНК с ензима *TaqI* отделя двата щам (Н1У-16К и Н1У-30К) от останалите родове в самостоятелни профили, с което се потвърждават резултатите от секвенционния анализ за видовата им принадлежност – *K. ascorbata* и *K. cryocrescens*, съответно. Формираните по 16S рДНК *TaqI*-4 и *TaqI*-8 профили могат да послужат като база за сравнение с неизвестни изолати (Табл.5).

Щам Н1У-2К (ITS-4, *HinfI*-3, *TaqI*-1) е идентифициран след секвениране като *L. amnigena*. Рестрикционният анализ с ензима *TaqI* на 16S рДНК отделя вида от останалите, формирайки различен профил (Табл.6), който би могъл да бъде използван при сравнителни анализи на неизвестни щамове.

Щамовете Н1У-13К, Н1У-24К и Н1У-25К се описват с един и същи ITS – профил – ITS-5, но след секвениране се идентифицират като представители на

два рода – *Citrobacter* и *Raoultella*. Щам Н1У-13К е идентифициран като *C. gilleni*, Н1У-24К като *R. planticola* и Н1У-25К - *R. terrigena*, съответно. При рестрикционния анализ на ITS-23S участъка на рДНК с ензими *HinfI* и *TaqI* тези щамове формират еднакви профили (*HinfI*-5 и *TaqI*-8, съответно) (Табл.7). Съществуват литературни данни за близкото генетично сходство между родовете *Citrobacter* и *Klebsiella*, като отделни представители от първия род са отнесени по-късно към род *Buttiauxella*, а от втория – към род *Raoultella* (Müller et al., 1996; Spröer et al., 1999; Drancourt et al., 2001). Това обяснява попадането на щамовете Н1У-13К, Н1У-24К и Н1У-25К, както и на Н1У-14К, Н2У-3К, Н2У-4К и Н1У-31К в една и съща ITS – група (Табл.2), което показва много близка структура на рибозомалния оперон. Чрез рестрикция на 16S рДНК двата щам от род *Raoultella* (Н1У-24К и Н1У-25К) дават специфичен профил *TaqI*-2, който ги разграничават от останалите секвенирани видове (Фиг.7 и Табл.6), но не и помежду им, което показва голяма близост между двата вида и невъзможност те да бъдат разграничени с използвания от нас ензим. Щамът Н1У-13К, определен след секвенционния анализ като *C. gilleni*, при рестрикция на 16S рДНК участъка формира с *TaqI*-1 профил, различен от останалите щамове (Фиг. 6 и Табл. 6), което потвърждава резултатите от секвенирането.

Четири щам (Н1У-14К, Н1У31К, Н2У-3К, Н2У-4К), които са идентифицирани след секвениране като *B. agrestis* се характеризират с общ рестрикционен профил на ITS-23S с ензима *TaqI* (*TaqI*-2). Три от тях формират и еднакъв *HinfI*-профил (*HinfI*-4). Само щам Н1У-14К попада в *HinfI*-профил, еднакъв с щамове, идентифицирани към родовете *Buttiauxella*, *Citrobacter*, *Kluyvera* и *Raoultella*. Проведеният допълнителен рестрикционен анализ на 16S рДНК на четирите щам с *TaqI* показва, че те формират еднакъв профил, различен от този на щамовете от родове *Citrobacter*, *Kluyvera* и *Raoultella*. Този профил може да послужи при идентификацията на неизвестни видове, като характерен за вида *B. agrestis*, което показва разграничаващата стойност на този ензим в идентификацията на този вид.

Табл.6 Рестрикционен анализ с *TaqI* на 16S рДНК на изолираните щамове

Профил	Дължина на фрагментите, bp	Щамове		
		Активно състояние (H2Y)	Аестивация (H1Y)	Хибернация (H)
<i>TaqI</i> -1	220, 360, 800	-	H1Y-13K	H25K, H26K
<i>TaqI</i> - 2	220, 360, 820	-	H1Y-24K, H1Y-25K	-
<i>TaqI</i> -3	200, 220, 380, 600	H2Y-3K, H2Y-4K	H1Y-14K, H1Y-31K	H1K, H2K, H3K, H11K, H12K, H13K, H14K, H29K, H30K, H31K, H32K, H34K, H36K
<i>TaqI</i> -4	220, 320, 360, 570	-	H16K	-
<i>TaqI</i> - 5	180, 220, 360, 600	-	H1Y-2K	-
<i>TaqI</i> - 6	200, 220, 400, 650	-	-	H4K
<i>TaqI</i> - 7	160, 180, 220, 380, 400	-	-	H7K, H8K, H9K, H10K, H27K
<i>TaqI</i> - 8	180, 220, 300, 360, 570		H1Y-30K, H1Y-5cK;	-

Тринадесет щама, изолирани от охлюви в период на хибернация (H1K, H2K, H3K, H29K, H30K, H36K, H12K, H34K, H31K, H11K, H13K, H14K и H32K) принадлежащи към ITS-5 група се разделят на 4 групи според техния *HinfI* и *TaqI*-профил, формиран след рестрикция на ITS-23S рДНК. Пет от тях (H2K, H3K, H29K, H30K и H34K) притежават *HinfI*-5 и *TaqI*-1 профил (Табл. 7). Други пет щама (H11K, H12K, H13K, H31K и H36K) са с *HinfI*-7 и *TaqI*-3 профил (Табл.7). Два щама (H1K и H14K) имат *HinfI*-5 и *TaqI*-12 профил. Един от щамовете (H32K) се отделя самостоятелно от всички, формирайки *HinfI*-6 и *TaqI*-12 профил (Табл. 7). След рестрикцията на 16S рДНК с *TaqI* всички щамове генерират еднакъв профил, идентичен с този на щамовете (H1Y-14K, H2Y-3K, H2Y-4K, H1Y-31K), които след секвенирането са определени като *B. agrestis* (Табл. 5). Това ни дава основание да приемем, че посочените по-горе щамове принадлежат към род *Butiauxella*, а различните рестрикционни профили е възможно да се дължат както на вътревидово разнообразие (*B. agrestis*) или принадлежност към близки видове.

Табл.7 Характеристика на идентифицираните видове Грам-отрицателни бактерии, изолирани от охлюви *C. aspersum*

Вид	Щам	ITS-група	Профил при рестрикция на ITS-23S рДНК*		Профил при рестрикция на 16S рДНК**
			<i>Hinf</i> I	<i>Taq</i> I	<i>Taq</i> I
<i>A. oleivorans</i>	H1Y-1cK	ITS-1	-	-	-
<i>B. agrestis</i>	H2Y-4K, H1Y-14K, H1Y-31K	ITS-5	<i>Hinf</i> I-4	<i>Taq</i> I-2	<i>Taq</i> I-3
	H2Y-3K		<i>Hinf</i> I-5	<i>Taq</i> I-2	
	H2K, H3K, H29K, H30K, H34K		<i>Hinf</i> I-5	<i>Taq</i> I-1	
	H1K, H14K		<i>Hinf</i> I-5	<i>Taq</i> I-12	
	H32K		<i>Hinf</i> I-5	<i>Taq</i> I-12	
	H11K, H12K, H13K, H31K, H36K		<i>Hinf</i> I-7	<i>Taq</i> I-3	
<i>C. gilenii</i>	H1Y-13K	ITS-5	<i>Hinf</i> I-5	<i>Taq</i> I-8	<i>Taq</i> I-1
<i>E. kobei</i>	H1Y-3cK	ITS-2	<i>Hinf</i> I-2	<i>Taq</i> I-1	-
<i>L. amnigena</i>	H1Y-2K	ITS-4	<i>Hinf</i> I-3	<i>Taq</i> I-1	<i>Taq</i> I-5
<i>K. cryocrescens</i>	H1Y-30K	ITS-6	<i>Hinf</i> I-5	<i>Taq</i> I-8	<i>Taq</i> I-8
<i>K. ascorbata</i>	H1Y-16K	ITS-6	<i>Hinf</i> I-9	<i>Taq</i> I-12	<i>Taq</i> I-4
<i>P. carotovorum</i>	H4K	ITS-6	<i>Hinf</i> I-2	<i>Taq</i> I-6	<i>Taq</i> I-6
<i>P. chrysanthemii</i>	H27K	ITS-6	<i>Hinf</i> I-2	<i>Taq</i> I-14	<i>Taq</i> I-7
	H7K, H8K, H9K, H10K		<i>Hinf</i> I-1	<i>Taq</i> I-4	
<i>R. planticola</i>	H1Y-24K	ITS-5	<i>Hinf</i> I-5	<i>Taq</i> I-8	<i>Taq</i> I-2
<i>R. terrigena</i>	H1Y-25K	ITS-5	<i>Hinf</i> I-5	<i>Taq</i> I-8	<i>Taq</i> I-2
<i>R. ornitolyca</i>	H25K, H26K	ITS-5	<i>Hinf</i> I-4	<i>Taq</i> I-8	<i>Taq</i> I-1
<i>Pantoea sp.</i>	H1Y-12K	ITS-3	<i>Hinf</i> I-3	<i>Taq</i> I-78	<i>Taq</i> I-1

*Профилите са описани в Табл.

Щам H4K принадлежи към ITS-6 групата, заедно с още други 5 щамове (H4K, H7K, H8K, H9K, H10K и H27K), изолирани през същия период от жизнения цикъл на охлювите (Табл.2). След рестрикция на ITS-23S рДНК с ензима *Hinf*I, той се отделя заедно с щам H27K, формирайки профил *Hinf*I-2. Рестрикцията с *Taq*I отделя двата щамове в самостоятелни профили, различни от тези на останалите щамове - *Taq*I-6 и *Taq*I-14, съответно. След амплификация на 16S рДНК и последващ рестрикционен анализ с ензим *Taq*I двата щамове формират различни

профили. След секвениране те се идентифицират като *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (за щам Н4К) и *Pectobacterium chrysanthemi* (за Н27К). Щамовете Н7К, Н8К, Н10К, Н9К не се диференцират един от друг след рестрикцията на 16S на рДНК и формират профил идентичен с профила на щам Н27К, идентифициран като *P. chrysanthemi*. Разликите в техните *HinfI* и *TaqI* профили по ITS-23S рДНК е възможно да се дължи на вътревидово разнообразие, което се открива при много фитопатогенни бактерии, към които принадлежи този вид (Kizheva et al., 2011; Atanasova et al., 2007).

Щамовете Н25К и Н26К принадлежат към една и съща ITS-група (ITS-5), имат и еднакви *HinfI* и *TaqI*-профили на ITS-23S рДНК. Чрез рестрикцията с *TaqI* (*TaqI*-5) те се отделят от други щамове, принадлежащи към същата ITS-група и притежаващи същия *HinfI*-профил. След рестрикционния анализ на 16S рДНК с *TaqI* те формират еднакви профили, много близки, но все пак различаващи се от профилите на щамове Н1У-24К и Н1У-25К, идентифицирани като *R. planticola* и *R. terrigena*, съответно. Секвенционният анализ на щамовете Н25К и Н26К показва много близко сходство с вида *R. ornitolyca*.

Видовете *B. agrestis*, *Pantoea* sp., *C. gillenii*, *R. terrigena*, *K. intermedia*, *E. amnigenes* са изолирани от тракта на *H. pomatia* и *C. aspersum* от Charrier et al. (2006). Настоящото изследване потвърждава някои от тези видове, което показва, че те са постоянен компонент на резидентната микрофлора на охлювите. В това изследване за първи път от интестиналния тракт на *C. aspersum* са изолирани видовете *A. oleivorans*, *E. kobei*, *R. planticola*, *P. carotovorum*, *P. chrysanthemii*, *K. cryocrescens* и *K. ascorbata*.

В резултат на проведените молекулни анализи би могло да се обобщи, че в храносмилателния тракт на охлювите обитават повече от 13 вида бактерии, чиито физиолого-биохимични признаци и рестрикционни профили на ITS-23S и 16S рДНК са определени (Табл.7). Резултатите допълват базата данни за тези видове и могат да бъдат използвани в сравнителни таксономични цели.

Установено бе, че ITS-групите не винаги обединяват щамовете на ниво род. Така напр. ITS-5 групата обединява в себе си видове от различни родове - *Butiauxella*, *Citrobacter* и *Raoultella*, което показва необходимостта и от други анализи при родовото разграничаване на щамовете.

3.4. Изолиране на Грам-положителни бактерии

За характеризиране Грам-положителните бактерии са анализирани всички колонии развили се върху среди MRS, M17 и PCA. От тестваните 350 колонии само 162 изолата се оцветяват положително по Грам. Всички Грам-положителните бактерии са анализирани морфологично и разпределени по типове. Представители от всички морфологични типове са изолирани за фенотипно и генотипно характеризиране.

3.5. Фенотипна характеристика и идентификация на Грам-положителните изолати

3.5.1. Морфологична характеристика

Колониите са диференцирани в 6 основни морфологични типа. От тях като чисти култури са изолирани 122 щама, които са характеризирани фенотипно и генотипно.

Изследваните бактерии образуват малки до средни по размери колонии с гладък или неправилен край, с хомогенна или зърнеста структура, с плосък или изпъкнал профил и цвят вариращ от бяло до кремаво и жълто. Според морфологията на съставлящите ги клетки изолираните бактериите са с пръчковидна (35 изолата) или със сферична до овоидна форма (87 изолата), с различна големина, като при някои култури се наблюдава образуване на микрофомации – пакети и верижки, в зависимост от плоскостта на делене. В интестиналния тракт на *C. aspersum* най-разпространени са бактериите от морфологични типове 1 и 5 (22.95% и 20.49%, съответно), следвани от морфологични типове 3 и 2 (18.03% и 16.39%). Сравнително по-малък дял заемат представителите на морфологични типове 6 и 4 (12.29% и 9.93%).

Описаните морфологични типове варират количествено в пробите от активно състояние, аестивация, хибернация и новоизлюпени. Най-голямо морфологично разнообразие е установено в пробите от активно състояние (H2Y) и хибернация (H), където се откриват колонии от шестте морфологични типа. В периода на активно състояние (H2Y) преобладава морфологичен тип 1 – 48.65%, следван от типове 3, 4 и 5 (по 13.51%), като по-слабо представени са типове 2 и 6 – 5.40%. В

периода на хибернация преобладават морфологични типове 2 (33.96%), 3 (26.410%) и 1 (21.62%), следвани от тип 4 (18.9%). Останалите два типа (5 и 6) представляват сравнително малка част от микробното съобщество през този етап (съответно 7.54% и 3.77%). В пробите от новоизлюпени охлюви и аестивация са установени колонии само от четири морфологични типа - 1, 3, 5 и 6. В тези етапи от жизнения цикъл най-разпространените колонии на Грам-положителни бактерии се отнасят към морфологичен тип 5 (45% и 52%) и 6 (36% и 33%) и по-рядко се откриват колонии от типове 1 и 3 (едва 4% и 9%).

3.5.2. Биохимична характеристика и идентификация

Изолираните Грам-положителни бактерии са групирани чрез диференциращо оцветяване за ендоспори, каталазна и оксидазна активност. Способност да образуват ендоспори показват 15 изолата (12.29%), които се отнасят към морфологичен тип 6. Останалите щамове (107) не образуват спори. Продукция на каталаза и оксидаза е установена за 40 щама (32.78%), принадлежащи към морфологични типове 5 и 6. Останалите 82 изолата са отрицателни по отношение на спорообразуване, каталаза и оксидаза. Началните фенотипни анализи показват евентуална таксономична принадлежност на изолатите от тип 5 (стафилококи, необразуващи спори, каталазо- и оксидазо-положителни) към представителите на род *Staphylococcus*. Изолатите от тип 6 (пръчки, образувачи спори, положителни за каталаза и оксидаза) се доближават към характеристиките на представителите на род *Bacillus* и род *Clostridium*.

В настоящото проучване ние насочихме вниманието си към биохимичното характеризирание на представители от морфологични типове 1, 2, 3 и 4 (общо 82 изолата). Това са щамове, които не формират ендоспори и са каталазо- и оксидазоотрицателни, показващи характеристики, сходни с тези на млечнокиселите бактерии.

Представители от четирите морфологични типа (1, 2, 3 и 4) са характеризирани физиолого-биохимично чрез тестовете за бърза идентификация API 50CH и API 20 Strep. Типът на извършваната от тях млечнокисела ферментация е определен чрез установяване на продукцията на CO₂ при ферментация на глюкоза.

В популацията на изолираните от интестиналния тракт на *C. aspersum* млечнокисели бактерии преобладават отрицателните (хomoферментативни) по

този признак щамове – 70.73% (58 изолата), докато положителните (хетероферментативни) са 29.26% (24 изолата). Бактериите, метаболизиращи хексозите чрез гликолиза доминират през периода на летния сън (100%), в пробите от новоизлюпени охлюви (100%) и през активния период (83.3%). Това са представители на морфологични типове 1 (20 изолата), 2 (2 изолата) и 3 (8 изолата). През периода на зимния сън (хибернация) количеството на хомоферментативните бактерии (22 изолата) почти се изравнява с това на хетероферментативните (19 изолата).

При съпоставяне на резултатите от двата признака (газ от глюкоза и продукция на киселина от рибоза и глюконат) според типа на ферментативния метаболизъм популацията на интестиналните млечнокисели бактерии е хетерогенна и съставена от облигатно хомоферментативни (8 изолата), факултативно-хетероферментативни (50 изолата) и облигатно хетероферментативни (24 изолата). В хода на изследванията за първи път са изолирани облигатно хетероферментативни бактерии от охлювите *C. aspersum* и се потвърждава присъствието на другите две групи установено от Charrier et al. (2006) .

Почти всички млечнокисели бактерии (93%), изолирани от интестиналния тракт на *C. aspersum*, ферментират целобиозата. Те са разпространени във всички етапи на жизнения цикъл на охлювите и имат различен тип ферментативен метаболизъм (хомо – или хетероферментативен). Отрицателни по този признак са само 5 факултативно хетероферментативни щамове, изолирани през периода на хибернация.

Усвояването на ксилозата, като основен монозахарид в хемицелулозата, е важен признак при определяне на ферментативния потенциал на интестиналните бактерии. Тази захар се ферментира от 67.07% (55) от изолираните бактерии, разпространени предимно във фазата на хибернация (31 изолата). Отрицателни по отношение на ферментирането на рафиноза са факултативно хетероферментативни представители на морфологичен тип 2 и облигатните хомоферментативни изолати от морфологичен тип 1.

Способност да ферментират L-арабиноза проявяват 70.73% (58) от изследваните щамове, като 63.79% (37 изолата) от тях са изолирани от охлюви в активно състояние. Отрицателни по този признак са 24 изолата, срещани във всички фази от жизнения цикъл на охлювите.

Всички изолирани Грам-положителни бактерии метаболизират четири от ключовите растителни субстрати: глюкоза, фруктоза, маноза и галактоза. Изключение прави само 1 щам (изолиран от охлюви в хибернация), който не ферментира галактоза.

Микробната хидролиза на рафинозата е от съществено значение за храненето на охлювите, тъй като α -галактозидазата не е установена в комплекса от смилателните ензими, секретирани от стомашните им жлези (Charrier et al., 1997). Рафинозата, олигозахарид от семейството на α -галактозидите е съставен от галактоза, глюкоза и фруктоза. Субстратът рафиноза се ферментира от 40.24% (33 изолата) от Грам-положителната микрофлора на охлювите. Положителните по този признак са щамове принадлежат предимно към морфологични типове 3 и 4, разпространени през целия жизнен цикъл. Отрицателни по ферментацията на рафиноза са представители на морфологични типове 1 и 2.

Изучаването на ферментационния потенциал на изолираните от интестиналната екосистема млечнокисели бактерии чрез минитюаризираните системи за бърза идентификация показва съществени фенотипни различия между тях и позволи разделянето им в няколко групи. Първата група обединява щамове, които ферментират широк набор от захари като D-глюкоза, D-фруктоза, D-маноза, галактоза, целобиоза и техните ацетилирани или гликозилирани производни (N-ацетил глюкозамин, амигдалин, арбутин) и други, които се срещат в растителността, с която охлювите се хранят. Наблюдава се вариабилност по отношение на ферментацията на някои пентози като L-арабиноза, D-рибоза и D-ксилоза. Изолатите не усвояват цитрат, алкохоли получени от редуцирането на захари като D-манитол, D-сорбитол и ксилитол или поливалентни алкохоли като еритрол, инозитол и дулцитол. Идентификацията на тези щамове с програмата APILAB ги отнася към род *Lactococcus* (100%) и част от тях са най-близко до вида *L. lactis*. Морфологичната характеристика на тези щамове (коки със сферична форма, разположени по двойки и във верижки) е характерна за този вид. Представителите на *L. lactis* се характеризират с различни фенотипни варианти, които много трудно се разграничават. В изследваната група 20 щамове се отнасят с вероятност 99-100% към подвида "*lactis*". Останалите 8 изолата са със значително по-нисък процент на сходство. Фенотипните различия на щамовете предполага тяхната принадлежност към други подвидове на *L. lactis* или други видове от род *Lactococcus*, които не са включени в базата данни на APILAB. Понастоящем видът

L. lactis включва три подвида - *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris* и *L. lactis* subsp. *hordniae* (изолиран от цикада *Hordnia circellata*). В последните години към тази група е прибавен нов подвид *L. lactis* subsp. *tructae*, изолиран от чревната лигавица на кафява пъстърва (*Salmo trutta*) и дъгова пъстърва (*Oncorhynchus mykiss*) (Pérez et al., 2011). Това показва, че са необходими допълнителни генетични анализи за коректното идентифициране тези изолати.

Представители на втората група (общо 20 изолата) са бактерии с пръчковидна форма на клетките, които се разделят въз основа на ферментационните си профили в две подгрупи. Първата подгрупа обединява хетероферментативни щамове (12 изолата), ферментиращи глюкозата с отделяне на газ, докато втората включва факултативно хетероферментативни изолати продуциращи киселина от рибоза и глюконат (8 изолата). Двете групи се различават в усвояването на D-ксилоза, галактоза, L-арабиноза, сорбитол и α -метил D-манопиранозид. Сравняването на ферментационните им профили с наличната база данни чрез програмата APILAB показва, че щамовете от тази група принадлежат към род *Lactobacillus* и показват сходство с видовете *L. brevis* (95%), *L. plantarum* (100%), *Lactobacillus graminis* (89%) и *Lactobacillus curvatus* (91%). Видовете *L. brevis*, *L. graminis* и *L. curvatus* са изолирани от охлювите в състояние на хибернация (18 изолата), докато *L. plantarum* (3 изолата) се среща както в период на активно хранене, така по време на хибернация. Лактобацили не са изолирани от интестиналния тракт на новоизлюпените охлюви и по време на летния сън (аестивация).

Изолатите от морфологичен тип 3 (овоидни клетки и кокобацили, разположени по двойки) се разделят в две основни групи според способността си да образуват киселина от манитол, сорбитол, рафиноза и сорбоза и да хидролизират аргинин. В първата подгрупа са включени щамове (12 щама) положителни по маноза, сорбитол, сорбоза и арабиноза и отрицателни по аргинин и рафиноза. Втората подгрупа изолати (10 щама) образуват киселина от маноза, арабиноза и рафиноза, хидролизират аргинин, но не усвояват сорбоза и сорбитол. След анализ на данните с идентификационната програма APILAB всички изолати се отнасят към род *Enterococcus*. Фенотипните характеристики на щамовете от първата подгрупа показват сходство с видовете *Enterococcus pseudoavium* (91%), *Enterococcus avium* (92%) и *Enterococcus saccharolyticus* 90%. Тези видове са обединени в група I според идентификационната схема на ентерококите (Krieg et

al., 2011). Втората подгрупа щамове се доближават до видовете *E. casseliflavus* (93%), *Enterococcus gallinarum* (92%) и *Enterococcus mundtii* (90%), които са част от група II ентерококи.

Щамовете от групата на мезофилните хетероферментативни коки (12 изолата от морфологичен тип 4) се характеризират с широк ферментационен профил, усвоявайки голям набор от захари (Табл.15), присъщ на представителите на родовете *Leuconostoc* и *Weissella*. От изследваната група само един щам е определен като *Weissella confusa*, докато 4 изолата имат 99% сходство с вида *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*. Останалите щамове се отличават по способността си да ферментират арбутин, амигдалин, лактоза и се идентифицират като *Leuconostoc* sp.

3.5.3. Антибактериална активност на изолираните млечнокисели бактерии

Антибактериалната активност на избрани изолати млечнокисели бактерии е скринирана чрез „spot method” срещу четири тест-бактерии: *Salmonella enteritica* serotype *enteritidis*, *Salmonella* serotype *choleraesuis*, *B. subtilis* и *S. epidermidis*. За целта са използвани 12 щама, принадлежащи към род *Lactobacillus*, 12 – към род *Lactococcus* и три – към род *Leuconostoc*. Най-висока активност на представителите на род *Lactobacillus* (инхибиторна зона - 25-30 mm) е наблюдавана срещу *S. enteritica*, *S. choleraesuis* и *S. epidermidis*. Антибактериалната активност на щамовете от род *Lactococcus* и *Leuconostoc* варира в зависимост от тест-бактериите.

Двадесет щама са избрани за по-нататъшен анализ, при което антибактериалната активност е определяна на супрнатанти, получени от култивирането на щамовете в течна хранителна среда MRS. Използвани са пет тест-бактерии – *S. enteritica* serotype *enteritidis*, *E. coli*, *B. subtilis*, *S. epidermidis* и *Propionibacterium acnes*. Използвани са супрнатанти с нативно рН и такива с коригирано рН (6.5), за да се елиминира действието на млечната киселина, формирана в хода на култивирането на щамовете. Супрнатантите с нативно рН на всички щамове са активни срещу *S. enteritica* ser. *enteritidis*, като най-активни са някои щамове на вида *L. plantarum* и *L. brevis*. По-малък брой щамове потискат видовете *B. subtilis*, *S. epidermidis*, *E. coli* и *P. acnes* – съответно 16, 15, 12 и 3 щама. Само три щама на *Ln. mesenteroides* имат антибактериална активност

срещу *P. acnes*. Те запазват антибактериалната си активност и при неутрализиране на супернатантите. Термичното третиране на супернатантите при 60° и 80°C за 10 минути води до намаляване и изчезване на активността. Активността се губи и след след обработка с протеиназа К (Фиг.8). Това показва, че е възможно тези щамове да синтезират антибактериални вещества с бактериоцинова природа. Подобно на тях два щама на вида *L. brevis* (HP1/14 и HP1/27) също показват активност на неутрализираните си супернатанти спрямо Грам-отрицателните тест-бактерии.



Фиг.8 Антибактериална активност на неутрализирана клетъчна супернатанта от *Ln. mesenteroides* H2YLnP4/8 срещу *P. acnes*.

A - супернатанта с рН 6.5, B – супернатанта, обработена с протеиназа К, C- супернатанта, обработена при 60°C за 10 мин., D- супернатанта, обработена при 80°C за 10 min.

3.6. Молекулна характеристика и идентификация на млечнокисели бактерии, изолирани от храносмилателния тракт на *C. aspersum*

3.6.1. PCR амплификация на 16S/23S рДНК интергенни участъци в рибозомалния оперон с универсални праймери

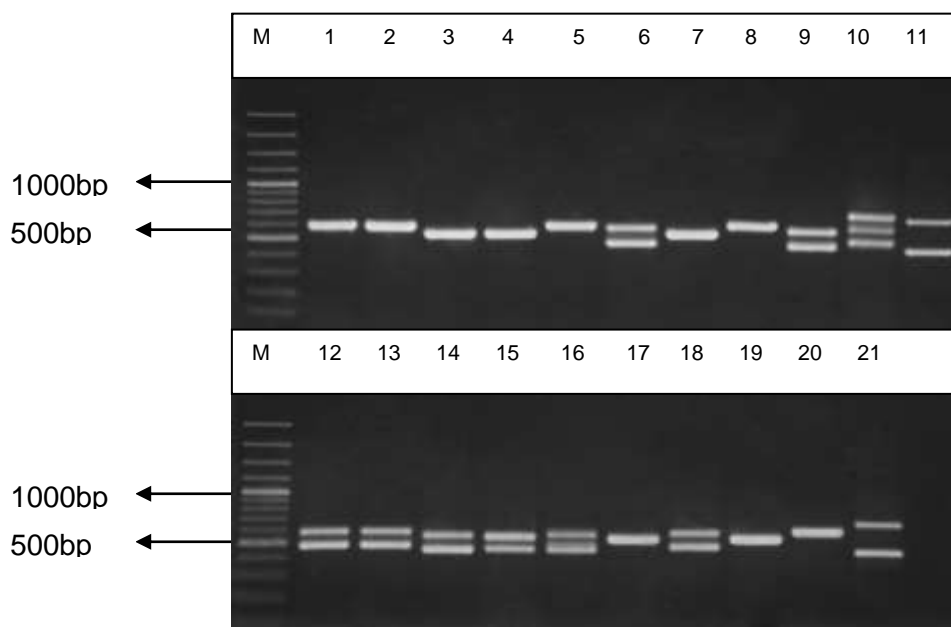
Молекулното типирание на изолатите от млечнокисели бактерии от интестиналния тракт на *C. aspersum* е реализирано въз основа на полиморфизма в дължината на интергенните участъци 16S-23S рДНК и броя на рибозомалите оперони. Представителите на четирите морфологични групи (82 изолата), са амплифицирани първоначално с универсалните праймери 16S/2 и 23S/10, при което те се разделят на шест групи въз основа на дължината и броя на амплифицираните фрагменти. За да се докаже, че анализираните участъци са компонент на рибозомалния оперон, получените PCR продукти са подложени на

nested PCR с вътрешни праймери 16S/4 и 23S/7. След амплификация с тези праймери получените PCR профили съдържат същия брой фрагменти, както в анализа с праймери 16S/2 и 23S/10, но имат по-малка дължина. След nested PCR-а изолатите запазват разпределението си в първоначално формираните шест групи, но профилите са по-лесни за софтуерна обработка. Затова в този раздел са представени ITS-профилите получени след амплификация с праймери 16S/4 и 23S/7 (Фиг.9 и 10).

Профил ITS-1 се характеризира с един амплификационен фрагмент (Фиг.9 и Табл.8) и се формира от представителите на морфологичен тип 1 (коки, разположени във верижки). Според фенотипната идентификация тези изолати (28) се отнасят към род *Lactococcus*. Щамовете с профил ITS-1 се срещат във всички етапи на жизнения цикъл на охлюва, но най-често са изолирани през периода на активно хранене (18 изолата) и хибернация (8 изолата). Единични щамове са открити при новоизлюпените охлюви и в периода на аестивация. Представителите на род *Lactococcus* се характеризират с един тип рибозомален оперон, в който интергенните спейсъри съдържат само ген за тРНК^{Ala}, който обаче не се кодира от терминалния 3'-ССА тринуклеотид (Nour et al., 1995; Naimi et al., 1997). Различните видове лактококите имат интергенни участъци с еднаква или много сходна дължина, което обяснява получаването на еднакви PCR профили при амплификация с универсални праймери. Изучаването обаче на секвенционната им последователност е показало висока степен на междувидов и вътревидов полиморфизъм (Kabadjova et al., 2002; Blaiotta et al., 2002), което определя 16S-23S ITS като подходящ участък за разработване на специфични молекулярни анализи (видово-специфични праймери, сонди, RFLP-ITS PCR) за бързо и надеждно разграничаване на лактококите (Blaiotta et al., 2002; Odamaki et al., 2011).

Щамовете от морфологичен тип 2 (клетки с пръчковидна форма) формират профил от два фрагмента с различна дължина (ITS-2) (Фиг.9 и Табл.8). Тези изолати се откриват в интестиналния тракт на охлюва най-вече в периода на хибернация (18), но могат да бъдат изолирани и по време на активно хранене (2). В настоящото изследване профил ITS-2 не е установен в млечнокиселата интестинална микрофлора на новоизлюпените охлюви и в етапа на аестивация. Фенотипните характеристики насочват тази група изолати към представители на род *Lactobacillus*. Получените PCR-ITS профили са идентични с такива от

изследвания на други автори (Berthier and Ehrlich, 1998; Kabadjova et al., 2002; Rachman et al., 2004) и потвърждават принадлежността им към групата на лактобацилите.



Фиг.9 PCR на интергенните участъци 16S/23S рДНК на млечнокисели изолати след амплификация с праймери 16S/4 и 23S/7.

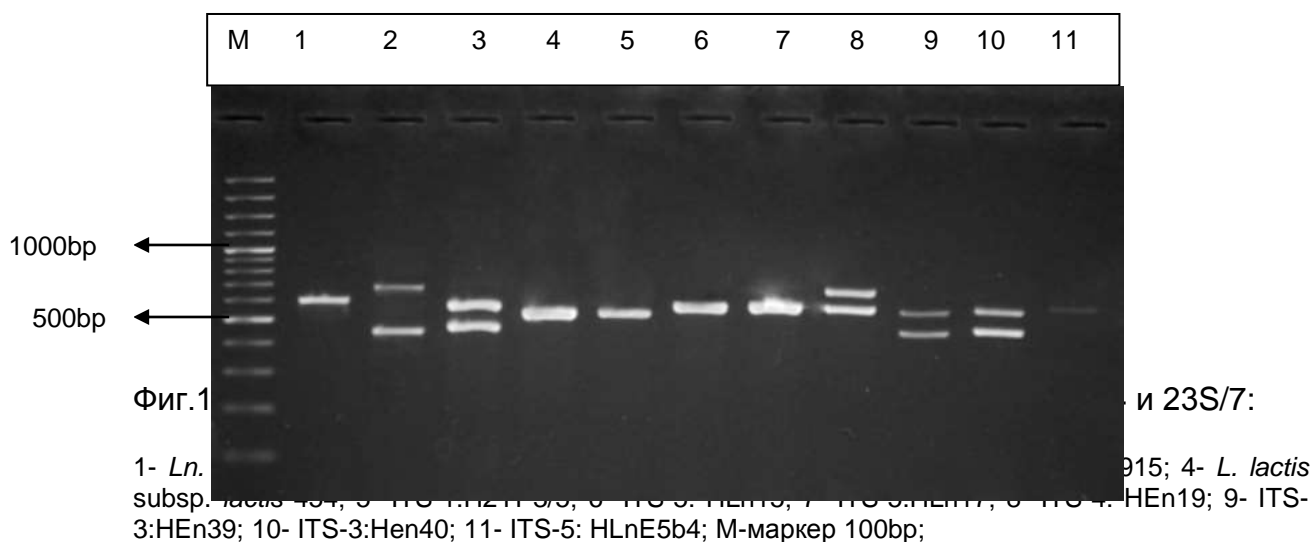
1- ITS-5: H2YLnP3/3; 2- ITS-5: H2YLnP3/4; 3- ITS-1: H2YP3/5; 4 - *L. lactis* sp. *lactis* 454; 5- ITS-5: H2YLnP3/8; 6- ITS-3: H2YEnP3/9; 7- ITS-1: H2YP4/1; 8- ITS-5: H2YLnP4/8; 9- ITS-3: H2YEnP4/9; 10- ITS-6: HLn17; 11- ITS-2: HP1/30; 12- ITS-3: HEnP2/4; 13- ITS- 3: HEnP2/5; 14- *E. faecalis* 3915; 15- ITS-3: HEnP2/19; 16- ITS-1: HEnP2/24; 17- ITS-1 HLCp2/30; 18- ITS-5: HEnP2/32; 19- ITS-1: H2YP3/1; 20- *Ln. mesenteroides* ATCC 8293; 21- *L. plantarum* NBIMCC 297;

Изолатите (22) обединени в морфологичен тип 3 (клетки с овоидна форма) също формират амплификационни профили от два фрагмента, но с различна дължина от тази лактобацилите. Според метаболитен си профил тези бактерии се отнасят към род *Enterococcus*. Щамовете от тази морфологична група обаче се разделят в два ITS профила (ITS-3 и ITS-4). Профилът ITS-3 обединява по-голямата част (20) от изолатите, които имат идентични или много сходни PCR-профили. Тези щамове се срещат във всички етапи от жизнения цикъл на охлюва, но се изолират с най-голяма честота в периода на хибернация (12). Останалите два щамове (H19 и H41) показват амплификационни продукти с по-голяма дължина и формират профил ITS-4 (Фиг. 9 и Табл. 8).

Табл.8 Профили на млечнокисели бактерии, изолираните от интестиналния тракт на *C. aspersum* след амплификация на интергенните участъци между 16S/23S рДНК в рибозомалния оперон.

ITS-профил	Дължина на фрагментите, Вр	Щамове			
		Ново-излюпени охлюви (НВ)	Активно състояние (H2Y)	Аестивация (H1Y)	Хибернация (H)
ITS-1 (28)	500	HBLc9 (1)	H2YLc1, H2YLc3, H2YLc8, H2YLc10, H2YLc11, H2YLc12, H2YP3/1, H2YP3/4, H2YP3/5, H2YP3/6, H2YP4/1, H2YP4/2, H2YP4/5, H2YP4/6, H2YP4/7, H2YP4/10, H2YP4/11, H2YP4/12 (18)	H1YLc31z (1)	HLcE1a, HLcE6, HLc15, HLc17, HLc24.1, HLc24.2, HLcP2/30, HLcP5/15 (8)
ITS-2 (20)	450, 650	-	H2YP4/3, H2YP4/4 (2)	-	HP1/1, HP1/2, HP1/3, HP1/4, HP1/5, HP1/9, HP1/14, HP1/22, HP1/24, HP1/26, HP1/27, HP1/28, HP1/30, HP1/33, HP5/4, HP5/5, HP5/8, HP5/9 (18)
ITS-3 (20)	450, 600	HBEEn5 (1)	H2YEn4, H2YEn5, H2YEn6, H2YEnP3/9, H2YEnP4/9 (5)	H1YEn3z, H1YEn27z (2)	HEn37, HEn38.1, HEn38.2, HEn39, HEn40, HEn42, HEn49, HEnP2/5, HEnP2/18, HEnP2/19, HEnP2/24, HEnP2/32 (12)
ITS- 4 (2)	550, 650	-	-	-	HEn41, HEn19 (2)
ITS- 5 (11)	600	-	H2YLn7, H2YLnP3/2, H2YLnP3/3, H2YLnP3/8, H2YLnP4/8 (5)	-	HLnE5b1, HLnE5b2, HLnE5b4, HLn15, HLn22, HLnP5/16 (6)
ITS- 6 (1)	450, 550, 650	-	-	-	HLn17 (1)

По-голямата част (20) от нашите изолати ентерококи от интестиналния тракт на *C. aspersum* имат профил ITS-3. Двата щам с ITS-4 се отнасят към профил *ITS-faecium*.



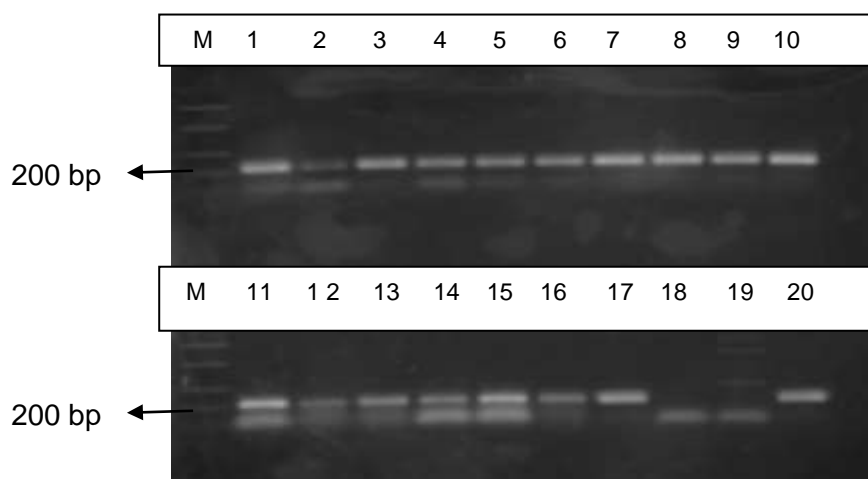
В профил ITS-5 попадат 11 изолата с един основен фрагмент (Фиг.9). В тази група повечето от щамовете са от морфологичен тип 4, които имат биохимични и метаболитни характеристики присъщи за представителите на род *Leuconostoc*. От този морфологичен тип изключение прави изолат HLn17, който формира три фрагмента (Фиг.9) и се отделя самостоятелно в профил ITS-6. Фенотипната характеристика насочва щам HLn17 (ITS-6) към представителите на род *Weissella*. Изолати от ITS-5 и ITS-6 са изолирани само в периодите на активно хранене и хибернация. Предствителите на род *Leuconostoc* имат един тип рибозомален оперон, който съдържа тРНК^{Ала}, докато видовете от род *Weissella* имат три типа рибозомални оперони, чиято структура не е проучена достатъчно.

Съпоставянето на фенотипните и молекулните характеристики предполага, че в групата ма млечнокиселите бактерии, изолирани от интестиналният тракт на *C. aspersum*, се откриват представители на родовете *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* и *Weissella*.

3.6.2. Идентификация на изолати от род *Lactobacillus* чрез nested PCR с родово специфични праймери

Предполагамата принадлежност на изолатите от ITS-2 към род *Lactobacillus* е доказана чрез амплификация с родово специфичните праймери R16-1/Lb/Ma-1 (Фиг.11). В качеството на ДНК проба са използвани амплификационните продукти, получени с универсалните праймери 16S/2 и 23S/10 от ITS анализа. Всички изолати (20), типови и референтни щамове (*L. plantarum* NBIMCC 297, *L. fermentum* NBIMCC 505 и *L.plantarum*738), генерират един фрагмент с дължина

250 bp, специфичен за представителите на род *Lactobacillus* (Dubernet et al., 2002). Амплифицираните като контроли щамове *L. lactis* ssp. *cremoris* 117 (CNRZ 117), *Ln. mesenteroides* ATTC 8293 не показват амплификационен продукт при тази PCR реакция (Фиг. 15). Тези резултати потвърждават принадлежността към род *Lactobacillus* на изолатите от морфологичен тип 2 и ITS-2 от интестиналния тракт на *C. aspersum*. Това е първото съобщение за присъствие на лактобацили в интестиналното съобщество на този вид охлюви. Участието на тази група бактерии в бактериалния консорциум е предполагаема и от други автори (Charrier et al., 1996; 2006), но при техните изследвания лактобацили не са открити. Присъстват данни за изолирани лактобацили от други представители на гастропода (Ugoh and Ugbenyo, 2013, Caullan et al., 2014).



Фиг. 11 Родово специфична nested PCR с праймери R16-1/ Lb/Ma-1.

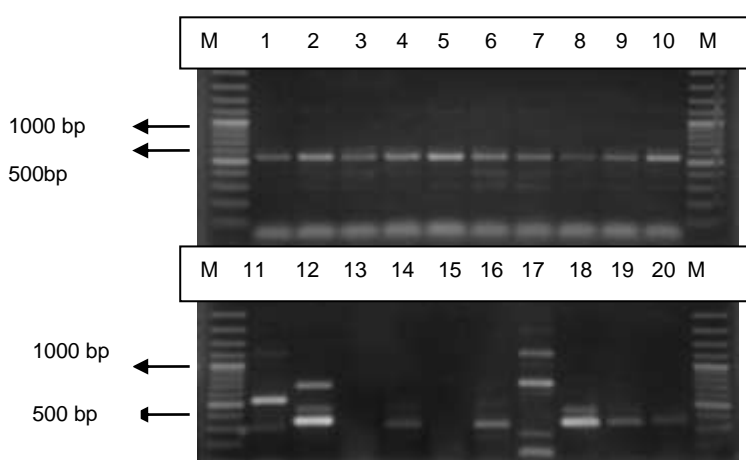
1 - *Lb. plantarum* 738; 2 - P1/2; 3 - P1/1; 4 - P1/4; 5 - P1/5; 6 - P1/14; 7 - P1/22; 8 - P1/24; 9 - P1/26; 10 - P1/27; 11 - *L. plantarum*738; 12 - P1/30; 13 - P5/4; 14 -P5/5; 15 - P5/8; 16-P1/9; 17-P4/4; 18– *Lc. lactis* 454; 19– *Ln. mesenteroides* ATTC 8293; 20- P1/28.

3.6.3. Характеризиране и идентификация на щамовете от род *Lactobacillus* чрез PCR амплификация с групово специфични праймери

Изолираните от интестиналния тракт на охлювите лактобацили са характеризирани чрез двустепенен мултиплекс PCR. Първият мултиплекс PCR е осъществен с 4 групово-специфични праймери: Ldel-7, Lu1, Lu-5, Lu-3 и Lac2 (Фиг 12).

За конструирането на групово-специфичните праймери е използван полиморфизмът в секвенциите на 16S-23S рДНК на различни видове от род *Lactobacillus* (Song et al., 2000). Според Song et al. (2000) лактобацилите се

разделят в четири генетични групи в зависимост от сигнатурата на интергенните спейсъри. Група I обединява всички подвидове на *L. delbrueckii* (*L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* ssp. *delbrueckii* и *L. delbrueckii* ssp. *lactis*); Група II обединява видове от комплекса на *L. acidophilus* (*L. acidophilus*, *L. amylovorus*, *L. crispatus*, *L. gasserii*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus jensenii*, *L. johnsonii*); Група III - видове генетично близки до *L. casei* (*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*, *L. paracasei* ssp. *tolerans*) и група IV – (*L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *Lactobacillus salivarius*). Праймер Ldel-7 е специфичен за подгрупата *delbrueckii*, LU-1` - за подгрупата на *acidophilus* и LU-5` и LU-3` амплифицират съответно бактериите от група III и група IV.



Фиг. 12 Мултиплекс PCR с групово специфични праймери

1-11 щамове P1/1; P1/2; P1/3; P1/4; P1/5; P1/14; P1/22; P1/24; P1/26; P1/27; P1/28; 12- P1/30; 13-P5/4; 14-P5/5; 15- P5/8; 16- P5/9; 17- P4/3; 18- *Lb. plantarum* 73; 19 – P6/1; 20-P6/4.

При първата мултиплекс реакция само 6 щамове (P1/30, P4/4, P5/4, P5/5, P5/8 и P5/9) формират амплификационен продукт от 350 bp, специфичен за видовете от група IV. Тези щамове са подложени на втори мултиплекс PCR с видово специфични праймери, идентифициращи *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. reuteri* и *L. salivarius*. При този анализ само два изолата (P1/30 и P4/4) са идентифицирани като *L. plantarum*. Останалите 4 щамове (P5/4, P5/5, P5/8 и P5/9) не дават положителна амплификация и не се идентифицират на този етап до вид. Ферментационните профили на тези четири щамове показват сходство към видовете *L. curvatus* (91%), *L. graminis* (89%), или *Lactobacillus sakei* (87%), за

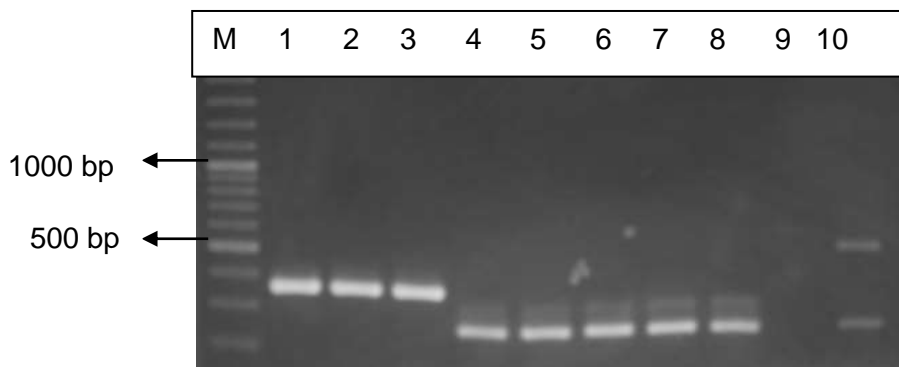
които не са включени видово-специфични праймери в мултиплекс схемата на Song et al. (2000).

Останалите 14 щама лактобацили формират амплификационен продукт с неспецифична дължина от 500 bp, който не позволява изолатите да бъдат отнесени към описаните от Song генетични групи. Ферментационните профили на тези щамове показват подобие с *L. brevis* (90%). Проведеният PCR с видово-специфични праймери (LbrF/LbrR) за вида *L. brevis* обаче не доведе до получаване на амплификационен продукт. Тъй като в литературата са описани редица случаи, когато видово-специфични праймери не формират очаквания PCR продукт (Senan et al., 2008) използвахме други молекулни подходи (секвениране на 16S рДНК) за идентификация на тази група лактобацили.

3.6.4. Идентификация на изолати от род *Lactococcus*, *Leuconostoc* и *Enterococcus* чрез PCR амплификация с видово-специфични праймери

Щамовете с предполагаема принадлежност към родовете *Lactococcus* (22), *Leuconostoc* (12) и *Enterococcus* (22) са амплифицирани с видово-специфични праймери за видовете *L. lactis* subsp. *lactis*, *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (Cho et al., 2009), *E. casseliflavus*, *E. faecium* и *E. faecalis* (Bensalah et al., 2006; Švec et al., 2002). За потвърждаване на принадлежността на щамовете към видовете *L. lactis* subsp. *lactis* и *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* е приложен мултиплекс PCR с две двойки праймери LlaF/LlaR и LmeF/LmeR (Фиг. 13), докато ентерококите са амплифицирани чрез PCR амплификация с праймери CA1/CA2, Efm1/Efm2 и Efs1/Efs2.

От 22 изолата с предполагаема принадлежност към род *Lactococcus*, 18 дават положителна реакция с видово-специфичните праймери за *L. lactis* subsp. *lactis*, формирайки амплификационен продукт от 248 bp (Фиг.13). Останалите четири щама най-вероятно се отнасят към други видове от този род.



Фиг.13 Мултиплекс PCR с видово специфични праймери за *Ln. mesenteroides* (LmeF/LmeR) и *Lc. lactis* (LlaF/LlaR).

1 - P3/2; 2 - P3/8; 3 - P4/8; 4 - 2/30; 5 - 3/1; 6 - 3/5; 7 - 3/6; 8 - 4/1; 9 - P3/31; 10 - P3/4

Чрез мултиплекс-PCR е установена принадлежността на четири щама към *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* на базата на положителния амплификационен фрагмент от 358 bp (Фиг.13). Останалите 8 щама трябва да бъдат идентифицирани чрез други молекулни подходи.

Амплификацията на всички щамове ентерококи идентифицира като *E. casseliflavus* само два изолата. Щамове P4/9 и H38.2 дават амплификационен фрагмент от 288 bp с видово-специфични праймери CA1/CA2. За присъствието на този вид в чревния тракт на охлювите свидетелстват и изследванията на Charrier et al. (1998), които дори го определят като доминираща микрофлора. Нашите резултати показват обаче, че в популацията на ентерококите присъстват и други видове, които има значително по-голям дял от този на вида *E. casseliflavus*.

3.6.5. Секвениране на млечнокисели изолати

За характеризиране до вид избрани изолати са амплифицирани с универсалните праймери 27F/1492R за 16S и продуктите са секвенирани в Macrogen (Korea). Получените секвенции са обработени и сравнени чрез програмата Blast с базата данни на GenBank NCBI. Според тези резултати (Табл. 9) в интестиналния тракт на *C. aspersum* са разпространени следните видове: *L. brevis*, *L. graminis*, *L. curvatus*, *L. plantarum*, *L. lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus taiwanensis*, *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus raffinolactis*, *Ln. subsp. mesenteroides*, *Leuconostoc gelidum*, *E. casseliflavus*, *Vagococcus penali*, *E. avium*, *E. pseudoavium*, *E. gallinarum*, *E. saccharolyticum* и *W.confusa*.

Табл.9 Секвенционнионен анализ на избрани грам-положителни щамове, изолирани от охлюви *C. aspersum*

Щам	16S рДНК базирана идентификация	Хомоложност	Референтни видове
HP1/4, HP1/14, HP1/27, HP1/28, HP1/24, HP1/22	<i>L. brevis</i>	99%	ref NR_075024.1
HP1/1, HP1/26	<i>L. brevis</i>	100%	ref NR_075024.1
HP5/4, HP5/8, HP 5/9	<i>L. curvatus</i>	99%	ref NR_042437.1
HP5/5	<i>L. graminis</i>	99%	ref NR_042438.1
H P1/30, H2Y-P4/3	<i>L. plantarum</i>	100%	ref NR_075041.1
HBLc9, H2Y P3/6	<i>L. lactis subsp. lactis</i>	99%	NR_103918.1
HLc24.1	<i>L. taiwanensis</i>	97%	NR_114327.1
H2YLc12	<i>L. garvieae</i>	97%	NR_102968.1
H2YP3/4	<i>L. raffinolactis</i>	97%	emb AM943053.1
H2YLnP3/8	<i>Ln. subsp. mesenteroides</i>	99%	JF261155
H2Y LnP3/3	<i>Ln. gelidum</i>	100%	NR_102984.1
H2YenP4/9	<i>E. casseliflavus</i>	99%	NR_119280.1
HEnP2/19	<i>V. penali</i>	99%	ref NR_116618.1
H2YenP3/9	<i>E. avium</i>	99%	dbj AB932546.1
HEnP2/5	<i>E. pseudoavium</i>	97%	ref NR_115762.1
H1Y3z	<i>E. gallinarum</i>	99%	dbj AB904773.1
H1Y27z	<i>E. saccharolyticum</i>	92%	ref NR_113909.1
HLn17	<i>W.confusa</i>	94%	FJ429978.1

4. Метагеномен анализ на микробното разнообразие в гастроинтестиналния тракт на *C. aspersum*

В настоящото изследване за първи път се прилага метагеномният анализ за изучаване на микробното разнообразие в гастроинтестиналния тракт на *C. aspersum*.

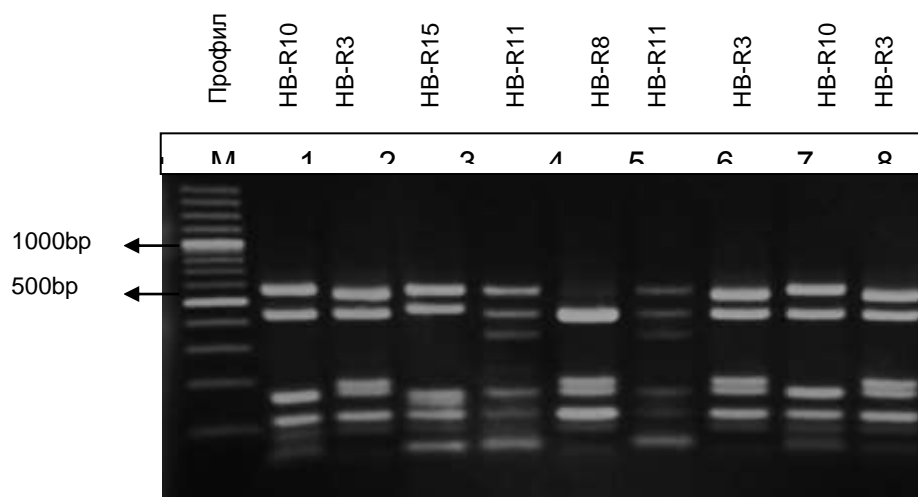
4.1. Характеризиране на бактериалното разнообразие

Обект на метагеномния анализ за изучаване на некултивируемата микрофлора е тотална ДНК, изолирана от тракта на охлюви в различни етапи от неговото развитие: новоизлюпени – НВ, активно хранене - H2Y и аестивация - H1Y.

Тоталната ДНК е използвана като матрица за амплифициране на 16S рДНК ген с универсални праймери 27F и 1492R. В резултат на проведената PCR реакция са получени амплификационни продукти (с дължина около 1500 bp), което е показател за присъствието на представители на домен *Bacteria* в съобществата от гастроинтестиналния тракт на охлювите.

За създаване на библиотека от клонове, всеки от амплифицираните фрагменти от 16S рДНК е клониран във вектор pJET 1.2 и получените конструкции са намножени след трансформация в компетентни клетки *E. coli* Дв 3.1. След селекция на среда с ампицилин са получени 312 положителни клона. За да се постигне висока степен на покриване на биологичното разнообразие всички положителни клонове са анализирани за коректност на дължината на включения в плазмидата фрагмент.

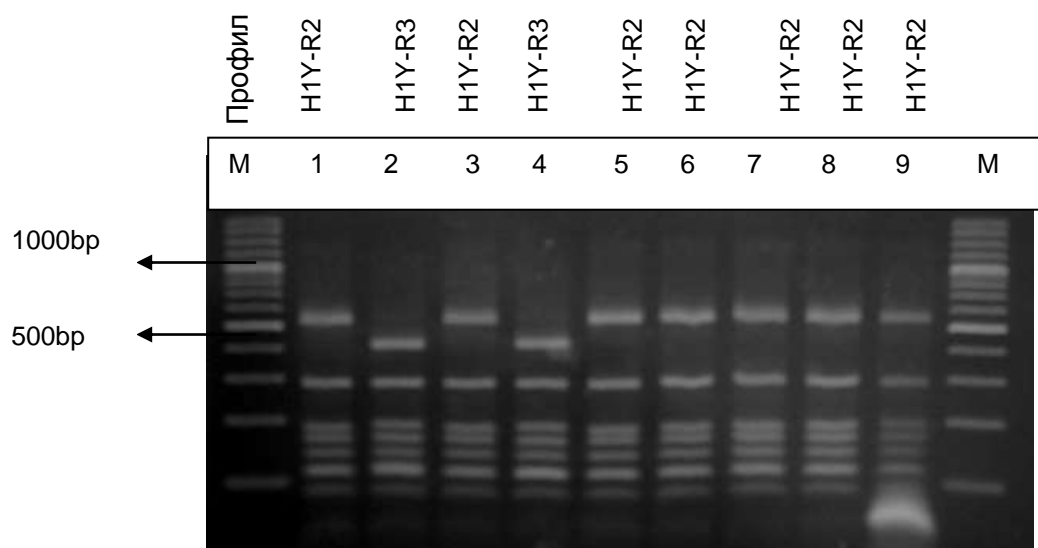
От изследваните 312 положителни клона около 50% съдържат фрагмент с очакваната дължина. Коректните 136 клона (съдържащи 16S рДНК) са скринирани чрез RFLP анализ с ензима *HpaII* с цел групиране според секвенционната последователност. Получените рестрикционни профили, съдържащи от 3 до 10 фрагмента с размери от 60 - 600 bp, са анализирани с програма VWR GenoSoft (Фиг. 14, 15 и 16). Рестрикционните библиотеки (групи) са формирани в зависимост от дължината и броя на рестрикционните фрагменти на 16S рДНК.



Фиг.14 Рестрикционни профили от клонова библиотека HB

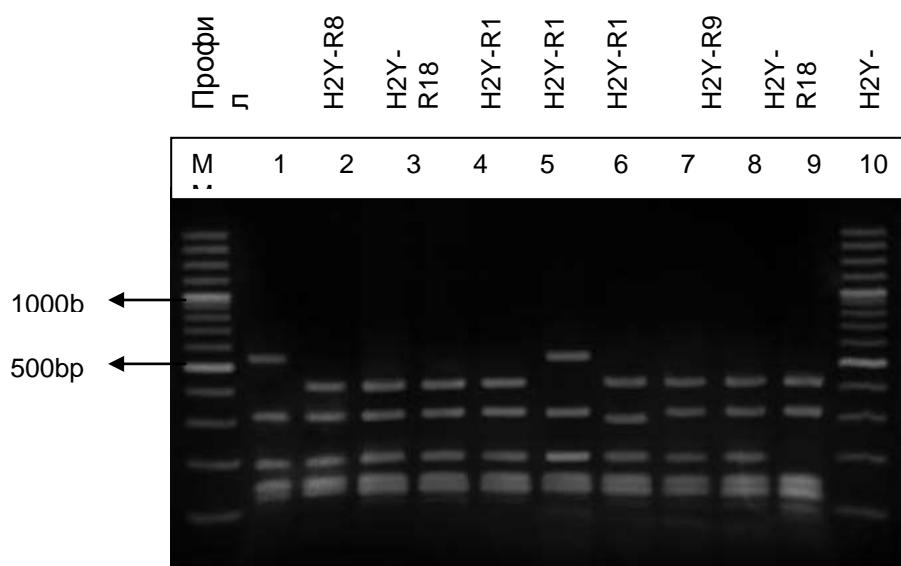
(новоизлюпени охлюви) получени при рестрикционен анализ с ензим *HpaII*.

1 - HB-11; 2 - HB-12; 3 - HB-33; 4 - HB15; 5 - HB-16; 6 - HB-17; 7 - HB-18; 8 - HB-19; 9 - HB-21; M- маркер 100bp.



Фиг.15 Рестрикционни профили от клонова библиотека H1Y (аестивация) получени при рестрикционен анализ с ензим *Hpa*II.

1 - H1Y-20, 2 - H1Y-41, 3 - H1Y-42, 4 - H1Y-43, 5 - H1Y-51, 6 - H1Y-54, 7 - H1Y-57, 8 - H1Y-58, 9 - H1Y-92, M-маркер, 100bp.



Фиг.16 Рестрикционни профили от клонова библиотека H2Y (активно състояние) получени при рестрикционен анализ с ензим *Hpa*II.

1 - H2Y-64; 2 - H2Y-66; 3 - H2Y-68; 4 - H2Y-70; 5 - H2Y-71; 6 - H2Y-72; 7 - H2Y-73; 8 - H2Y-74; 9 - H2Y-75; 10 - H2Y-78; M-маркер 100 bp.

Клоновете с идентични рестрикционни профили са групирани като отделни филогенетични типове. Формирането на 48 различни рестрикционни групи (16 в проба НВ, 27 в проба H2Y и 5 в проба H1Y) предполага високо разнообразие на присъстващите в интестиналния тракт бактериални таксони. Шест от всички типове в НВ (новоизлюпени охлюви) и 13 в H2Y (активно хранене) са представени

само с по един клон. В библиотека H1Y (аестивация) не се откриват рестрикционни профили формирани от един клон. Изчислената по този критерий висока степен на покриване на биологичното разнообразие (82% за HВ, 83% за H2Y и 100% за H1Y) дава възможност за по-задълбочено характеризиране на бактериалното разнообразие в интестиналното съобщество от различни етапи от жизнения цикъл на охлюва.

След секвениране на избрани представители от всяка рестрикционна група (Macrogen, Южна Корея), получените секвенции са сравнени с депозираните в базата данни на NCBI и са определени възможно най-близкородствените секвенции.

4.1.1. Филогенетичен анализ на бактериалните съобщества от интестиналния тракт на новоизлюпени охлюви (HВ)

Анализираните 34 клона от библиотека HВ са групирани в 16 филотипа, отнесени към 3 признати бактериални типа: *Proteobacteria* (14), *Actinobacteria* (1) и *Bacteroidetes* (1). В проба HВ доминират бактериите, отнасящи се към клас γ -*Proteobacteria* (91%) и само по един клон се отнасят към класовете β -*Proteobacteria*, *Bacteroidia* и *Actinobacteria*. Клоновете отнесени към тип *Proteobacteria* образуват най-голям брой рестрикционни групи - 14 филотипа, които са отнесени към 7 познати рода. Степента на припокриване на биологичното разнообразие на клоновете от клонова библиотека HВ е много високо (82%) и може да даде ясна представа за структурата на съобществото и метаболитната активност през този етап от жизнения цикъл на охлюва.

Получените резултати за идентификация на клонове от 16-те рестрикционни групи определят като доминиращи за новоизлюпените охлюви представителите на род *Kluyvera* (41%), които са представени в 5 рестрикционни групи. В изследваната група 50% се идентифицират с култивируеми (98%) и некултивируеми (99%) клонове от вида *K. ascorbata*. Останалата част от клоновете показват сходство (95-99%) със секвенции, изолирани от различни местообитания, характеризирани като *Kluyvera* sp. Представителите на род *Kluyvera* са постоянен компонент на интестиналната микрофлора на различни видове охлюви като *H. pomatia*, *C. aspersum* (Charrier et al., 2006) и *A. fulica* (Pawar et al., 2012). В клонова библиотека от хранопровода на гигантския африкански охлюв *A. fulica* (в активно състояние), секвенциите на *K. ascorbata* заемат 10.9%

(Pawar et al., 2012).

Втората група секвенциите, които представляват 17.6% от клоновете в библиотеката НВ показват сходство с представители на род *Klebsiella*. Половината клонове (3) съдържат секвенции с 98% сходство към вида *Klebsiella pneumoniae*. Останалата част от тази група се идентифицират като некултивируеми клонове отново най-близка до този вид, поради което формират самостоятелна рестрикционна група. Присъствието на бактерии от род *Klebsiella* е установено при изучаване на хепатопанкреаса и червата на охлюви от вида *H. aspersa Müller* (Villena et al., 2010), докато от чревния тракт на охлюва *Pomacea canaliculata* е изолиран щам *Klebsiella* sp. с висока целулолитична активност (Al-Arif et al., 2012).

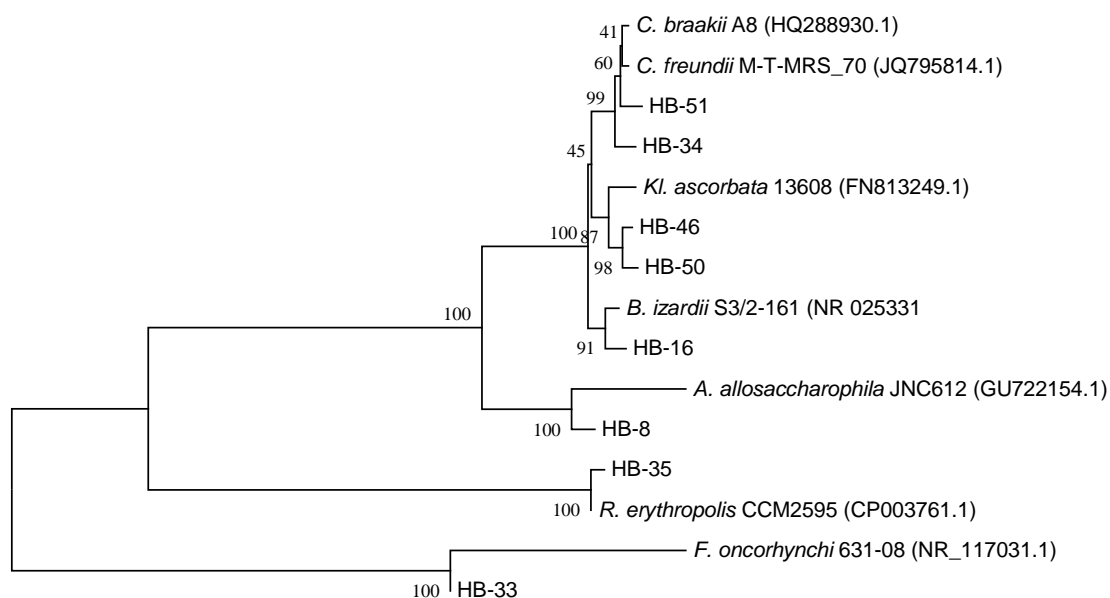
Трета група секвенции (14%), обединени в два рестрикционни профила от клонова библиотека НВ на *C. aspersum*, показват таксономично значимо сходство с представителите на род *Citrobacter* и се идентифицират съответно като видовете *C. freundii* (99%) и *C. braakii* (98%). Представители на род *Citrobacter* са компонент на интестиналната микрофлора в различните етапи от развитието на охлювите. Видовете *C. braakii*, *C. youngae*, *C. freundii* са изолирани от фецеси на охлюви от вида *Arianta arbustorum*, при изследване на вещества влияещи върху състава на чревната микрофлора (Kowalczyk-Реска и Stryjecki, 2013). *C. freundii* има доминиращ дял (36.8%) в клоновата библиотека на *A. fulica* в активно състояние, като населява хранопровода, гушата, червата и ректума (Pawar et al., 2012). *C. gilenii* и *Citrobacter* sp. са открити при изучаване на биологичното разнообразие на охлюви в аестивация от видовете *H. pomatia* и *C. aspersum* (Charrier et al., 2006). Извън чревния тракт, представителите на род *Citrobacter* са опортюнистични микроорганизми. От 11 вида принадлежащи към род *Citrobacter* 10 са условно патогенни за хората и водят до инфекции на пикочните пътища и централната нервна система, индуцират бактериемия и болнични инфекции (Samonis et al., 2009, Kocharova et al., 2010). Най-често заболявания като остър некротичен панкреатит се свързва със заразяване с *C. freundii* и някои други представители на сем. *Enterobacteriaceae* (Samonis et al., 2009).

Два от профилите включват клонове (8.8%) идентифицирани като некултивируеми клонове от сем. *Enterobacteriaceae*. Те са с най-голяма близост до род *Buttiauxella* и видовете *B. izardii* - 98% и *B. brennerae* - 92%. Основното местообитание на повечето видове от род *Buttiauxella* е интестиналният тракт на

молюските (градински охлюви и голи охлюви) и дъждовните червеи, но могат да се развиват в питейната вода и почвата (Müller et al., 1996). *B. agrestis* и *Buttiauxella* sp. са постоянни обитатели на тракта на *H. pomatia* в етапа на активно хранене (Charrier et al., 2006), но отсъстват в гладуващи охлюви (Nicolai et al., 2005), докато *B. noackiae* е открита в *C. aspersum* (Charrier et al., 2006).

В библиотека HB се открива един филотип (2.9%), който показва 99% сходство с представител на сем. *Nocardiaceae* – *R. erythropolis* CCM2595. Представителите на род *Rhodococcus* са метаболитно гъвкави видове, които често се откриват в природата и имат потенциално приложение в биоремедиацията, биотрансформацията и биокатализата. Някои видове обаче са патогени по хората, като предизвикват заболявания при имунокомпромитирани пациенти (Mikić et al., 2014). В литературата присъстват много данни за представителите на род *Rhodococcus* и за техните изключителни способности в биодеградацията на различни съединения, биосинтезата на липиди и биоповърхностно активни вещества, в адаптацията и толеранса им към разтворители (Alvarez, 2010).

За един от профилите (2.9%) е установено 94% сходство с некултивируем клон, най-близък до *F. oncorhynchi*. Поради големината на анализираната секвенция (1200 bp) и установеното само 94% сходство с *F. oncorhynchi* вероятно се касае за нов вид близък до род *Flavobacterium*. Род *Flavobacterium* включва 130 вида Грам-отрицателни неподвижни и подвижни пръчковидни бактерии, както и 3 ново предложени вида (*Flavobacterium gondwanense*), *Flavobacterium salegens* (Dobson et al., 1993) и *Flavobacterium scophthalmum* (Mudarris et al., 1993). Бактериите от този рода се откриват в почви и чиста вода. Известни са няколко вида, причиняващи заболявания по сладководните риби (Bernardet et al., 1994).



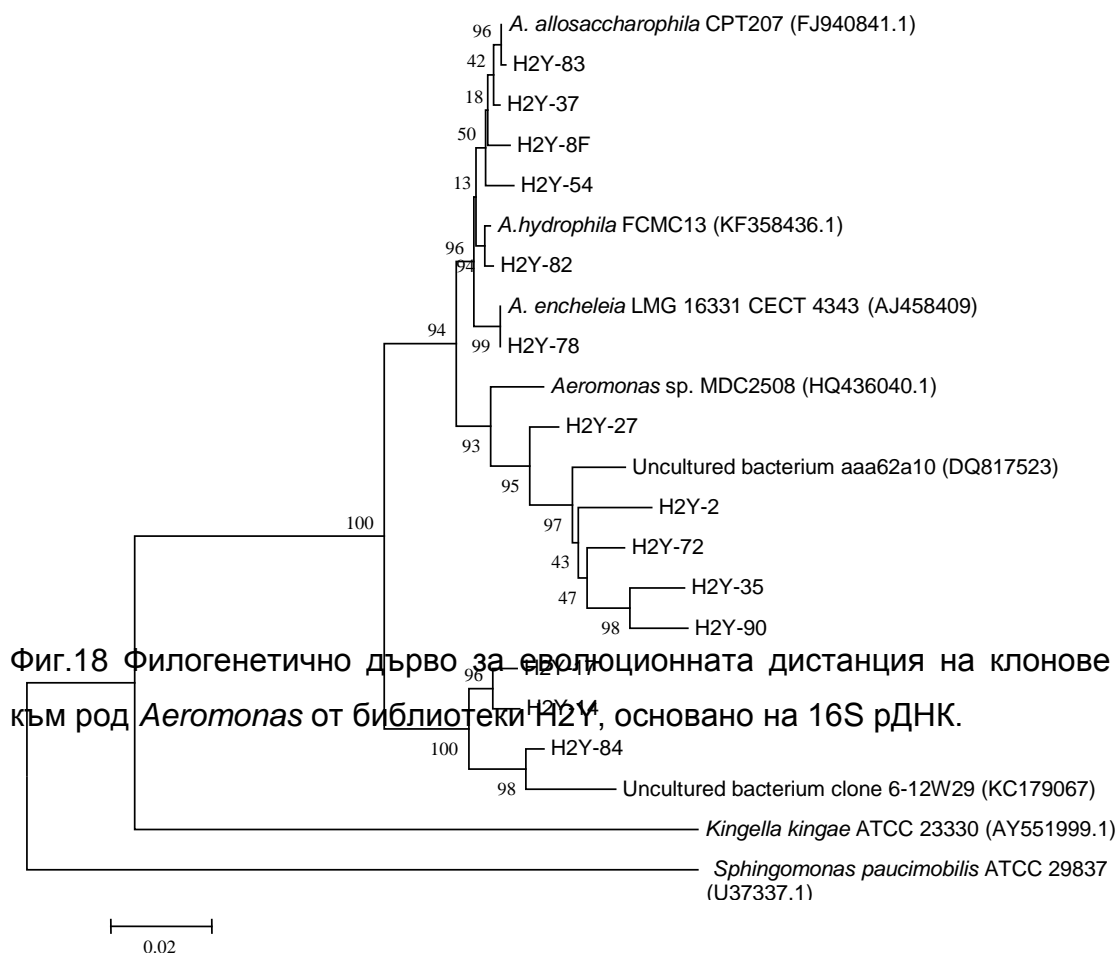
Фиг.17 Филогенетично дърво за еволюционната дистанция на клонове от библиотеки НВ, основано на 16S рДНК.

Линията в долния десен ъгъл показва филогенетично разстояние, съответстващо на 5% заместване в нуклеотидната секвенция. Регистрационните номера на секвенциите са посочени в скоби.

Представеният филогенетичен анализ (Фиг.17) показва, че всички клоновете отнесени към клас γ -*Proteobacteria* се групират със секвенции на представители от сем. *Enterobacteriaceae* (11) и сем. *Aeromonadaceae* (2) и ясно се разграничават от секвенциите близки до род *Rhodococcus* и до род *Flavobacterium*.

4.1.2. Филогенетичен анализ на бактериалните съобщества от интестиналния тракт на охлюви в активно хранене (H2Y)

Клонова библиотека H2Y се състои от 147 клонa, от които след скрининг са селектирани 78 коректни клонa. Секвенираните клонове се групират в два типа - *Proteobacteria* (98.8%) и *Fusobacteria* (1.2%), разпределят се в 27 филотипа отнесени към 12 бактериални вида. Всеки рестрикционен профил е съставен от един до 13 клонa, които покриват 83% от биологичното разнообразие в интестиналния тракт през периода на активно хранене.



Линията в долния десен ъгъл показва филогенетично разстояние, съответстващо на 5% заместване в нуклеотидната секвенция. Регистрационните номера на секвенциите са посочени в скоби.

В проба H2Y преобладават филотиповете отнасящи се към клас γ -*Proteobacteria*, сем. *Aeromonadaceae*, род *Aeromonas* (83.0%) (фиг.18) с установено сходство към видовете *A. allosaccharophila* (11.5%), *Aeromonas media* (6.5%), *A. hydrophila* (14.1%), *Aeromonas encheilia* (6.4%), *Aeromonas* sp. (12.8%), както и некултивируеми клонове (15.3%) много близки до род *Aeromonas*. Некултивируемите аеромонаси се разделят в два кластера, отдалечени един от друг, които образуват дълбоко разклонение във филогенетичното дърво и се различават съществено от останалите членове на род *Aeromonas* (Фиг.18). Присъствието на аеромонасите в храносмилателния тракт на охлюви през всички етапи на жизнения цикъл е установено с културални и молекулни методи (Kiebre-
Toe et al., 2003; Cardoso et al., 2012).

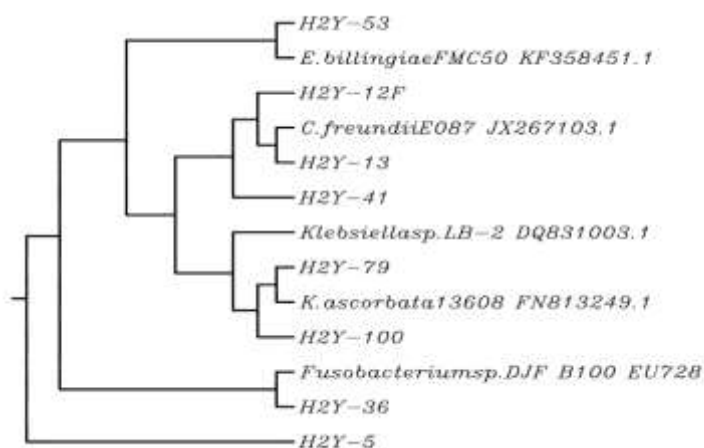
Три рестрикционни профила в библиотека H2Y обединяват 6.4% от клонове, които показват 99% сходство с представители на род *Citrobacter*. Две от рестрикционните групи се идентифицират с вида *C. freundii* (фиг.19), докато третата като *Citrobacter* sp. Клонове, съдържащи секвенции от вида *C. freundii* са идентифицирани и в библиотека НВ, където са представени в значително по-висок процент отколкото в библиотека H2Y. Смята се, че представителите на този род са коменсални обитатели в червата на хората и животните, най-вероятно като последствие от отделянето на фекалии, присъстват в околната среда и могат да бъдат изолирани от вода, канализация и почва (Sedlak, 1973; Brenner et al., 1999).

Доминиращите в библиотека НВ секвенции на *K. ascorbata* през периода на активно хранене са представени в минорни количества и само един клон (1.2%) е идентифициран с 98% сходство. Изследвания на други автори на микрфлората на активно хранени охлюви показват присъствие на други видове *Kluuvera*, като *K. cochleae* и *K. intermedia* (Müller et al., 1996; Charier et al., 2006).

Подобни са резултатите и за дела на секвенциите със сходство към род *Klebsiella* през този етап от жизнения цикъл. От проба H2Y са получени едва два клона, формиращи един профил (1.2%), които показват 98% сходство с *Klebsiella* sp. LB-2 (DQ831003.1)(фиг. 19). Представители, определени като *Klebsiella* sp., се откриват в широк кръг от бозайници (Gordon and FitzGibbon, 1999), присъстват в инсекти (Dillon et al., 2002) и вероятно в много други групи животни. В скакалците

Klebsiella sp. могат да допринесат заедно с други бактериални видове за синтезата на агрегационен феромон участващ в промяната на движение от самостоятелно движещи се скакалци към стадни форми (Dillon et al., 2002). За хлебарките се предполага че играят роля на вектори за тези бактерии в болнични среди (Cotton et al., 2000).

В библиотека H2Y се откриват секвенциите на три некултивируеми клона, които показват 98% сходство с клас γ - *Proteobacteria*. Следващият съсед с най-голяма близост до този филотип е *E. billingiae* FMC50. Род *Erwinia* включва най-вече растителни патогени, които са открити в храносмилателния тракт на някои насекоми и най-вероятно постъпват с храната (de Vries et al., 2010). Според някои автори тези бактерии са само транзитиращи (Thibout et al., 1995; Werren and O'Neill, 1997), докато други установяват симбиотични взаимодействия с постоянен характер с гостоприемниците. Предполага се, че муталистичните взаимоотношения между бактериите от род *Erwinia* и насекомите подобряват скоростта на яйцеснасяне от гостоприемника, подобряват физиологичното състояние на хлебарки, бръмбари и термити. (Bridges, 1981; Breznak, 1982; Cruden and Markovetz, 1984).



Фиг.19 Филогенетично дърво за еволюционната дистанция на клонове спадащи към сем. *Enterobacteriaceae* от библиотеки H2Y, основано на 16S рДНК.

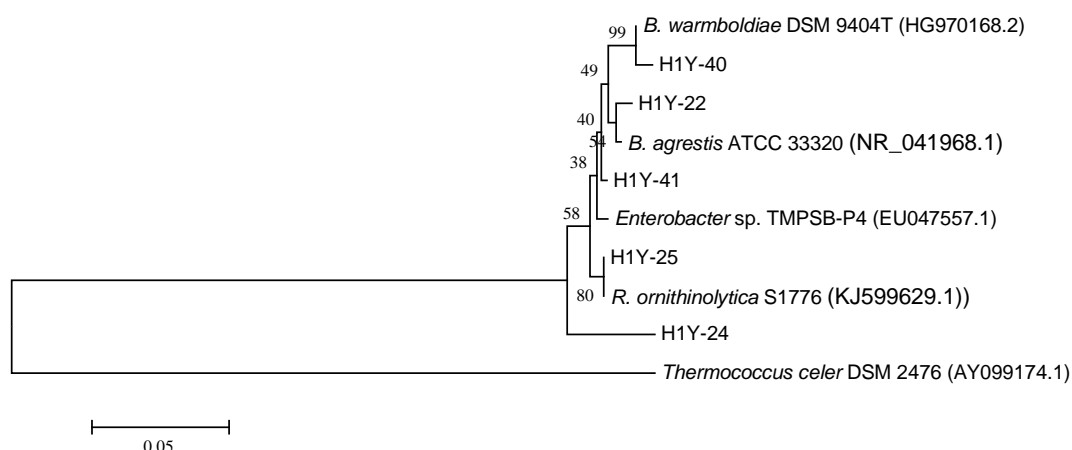
Линията в долния десен ъгъл показва филогенетично разстояние, съответстващо на 5% заместване в нуклеотидната секвенция. Регистрационните номера на секвенциите са посочени в скоби

В клонова библиотека H2Y е установена секвенция, определена като некултивируем клон, най-близка до клас *Fusobacteria*, сем. *Fusobacteriaceae* и род

Cetobacterium. Следващият съсед от NCBI, с който този клон има най-голямо сходство е *Fusobacterium* sp. DJF_B100. Род *Fusobacterium* са Грам-отрицателни неспорообразуващи бактерии, широко известни и изучавани като човешки и животински патогени. Изключителната способност на *Fusobacterium* да се прикрепя към Грам-положителната и Грам-отрицателната плака от микроорганизми в биофилмите (най-вече в меките тъкани) го прави изключително инвазивен патоген. Главно внимание се обръща на перидонталните последици, въпреки че щамове от *Fusobacterium* са идентифицирани като патогени в много части на тялото (Weinstock et al., 2004).

4.1.3. Филогенетичен анализ на бактериалните съобщества от интестиналния тракт на охлюви в аестивация Н1У

Получената клонова библиотека за проба Н1У е съставена от 111 клона. След скрининг като коректни са определени 24 клона, които се отнасят към клас *γ-Proteobacteria*. Рестрикционните профили се идентифицират с 98-99% сходство към 3 рода от сем. *Enterobacteriaceae*: *Buttiauxella* (70.8%), *Enterobacter* (8.3%), и *Raoultella* (20.8%) (Фиг. 36). Четири от профилите са съставен от по 7 фрагмента, но с различна дължина и само един е съставен от десет фрагмента. Степента на припокриване на биологичното разнообразие на клоновете от клонова библиотека Н1У е 100%. Филогенетичното групиране на секвенциите получени от клонова библиотека Н1У е представено на Фиг.20.



Фиг.20 Филогенетично дърво за еволюционната дистанция на клонове от библиотеки Н1У, основано на 16S рДНК типове от охлюви в аестивация.

Линията в долния десен ъгъл показва филогенетично разстояние, съответстващо на 5% заместване в нуклеотидната секвенция. Регистрационните номера на секвенциите са посочени в скоби.

В клонова библиотека Н1У доминиращи са представителите на род *Buttiauxella*, които са идентифицирани със сходство 99 и 98% към видовете *Buttiauxella warmboldiae* и *B. agrestis*. Установено е, че щамове *B. agrestis*,

изолирани от чревния тракт на *H. pomatia* в аестивация, са способни да усвояват хитин, което обяснява метаболитната роля на този вид (Charrier et al., 2006). Щамове от вида *B. warmboldiae* са открити в тракта на охлюви от Сидни, Австралия и Кейп Таун, Южна Африка (Müller et al., 1996).

Два профила от клоновата библиотека H1Y, обединяващи 20.8% от клоновете, принадлежат към род *Raoultella*. Три от клоновете се идентифицират с 99% сходство с вида *R. ornithinolytica* и два клона с 98% като *Raoultella* sp. *R. ornithinolytica* е открита и в чревния тракт и главата на мравки (*Myrmeleon mobilis*) (Dunn and Stabb, 2005). Charrier и сътр. (2006) изолират от интестиналния тракт на *C. aspersum* (в етап на аестивация) друг представител на този род - *R. terrigena*.

Един от профилите, съставен от три клона и представляващ 12.5% от клоновата библиотека, е определен със сходство 99%. като *Enterobacter* sp. TMP5B-P4. Следващият най-близък съсед в базата на NCBI е *Enterobacter ludwigii* LH.

4.1.4. Сравнителен анализ на клонови библиотеки HB, H1Y и H2Y

Сравнителният анализ на микробното разнообразие в клонови библиотеки HB, H1Y и H2Y, показват доминираща роля на представителите на клас γ -*Proteobacteria* с 100% за проба H1Y, 98.8% за проба H2Y и 88.2% за проба HB. Този клас е представен от два основни таксона сем. *Enterobacteriaceae* и сем. *Aeromonadaceae*. В пробите от охлюви са установени секвениции на представители на следните родове от сем. *Enterobacteriaceae*: *Citrobacter*, *Kluyvera*, *Buttiauxella*, *Klebsiella*, *Erwinia*, *Enterobacter* и *Raoultella*. Голям дял заемат представителите на сем. *Aeromonadaceae*, род *Aeromonas* в пробата на активно хранене H2Y.

В пробата от новоизлюпени охлюви (HB), освен представителите на клас γ -*Proteobacteria*, са открити клас *Actinobacteria*, сем. *Nocardiaceae* и клас *Bacteroidetes*, сем. *Flavobacteriaceae*, докато в проба H2Y е установен *Cetobacterium*, отнасящ се към клас *Fusobacteria* и сем. *Fusobacteriaceae*.

ДИСКУСИЯ

Изучаването на динамиката и разнообразието на бактериалното съобщество в интестиналния тракт на охлювите от вида *C. aspersum* е проведено чрез анализиране на охлюви през различни етапи от техния жизнен цикъл.

За проследяване на измененията в микробното разнообразие в зависимост от настъпващите физиологични промени по време на жизнения цикъл на охлювите е използван ARDRA анализ. Анализирани са два типа ДНК – едната представляваща тоталната, а другата култивируемата компонента на чревната микробиота. След амплификация с универсални за 16S рДНК праймери (27F и 1492R) е проведен рестрикционен анализ с набор от рестрикционни ензими. Сред тях ензимите *Csp6I* и *Hin6I* формираха различни профили, съставени от различен брой фрагменти. Чрез този анализ са установени разлики както между култивируемите, така и между тоталните ДНК през различните етапи от жизнения цикъл на охлювите. Кластерният анализ на получените резултати ясно показва, че съставът на микробното съобщество в интестиналния тракт се влияе от сезонната ритмика и отговаря с промяна в своя състав и структура, което показва ролята на това съобщество за функционирането на охлювите по време на техния жизнен цикъл.

Чрез анализирането на култивируемата компонента на микробиотата могат да се направят заключения за процесите, които се извършват в храносмилателния тракт на охлювите и ролята на микроорганизмите в тях. В тази връзка са проследени промените, които настъпват в общия брой на бактериите, сред които на ентеробактерии, ентерококи, млечнокисели бактерии, както и физиологичните групи на амилалитичните, протеолитичните и целулозоразлагащите бактерии. Установено е, че микробното съдържание на интестиналния тракт варира през различните етапи, като общият брой на бактериите е най-висок през активния период. Ентеробактериите и млечнокиселите бактерии присъстват във всеки етап от жизнения цикъл, като с най-голяма численост са в активния период и по-рязко или по-плавно намаляват в периодите на аестивация и хибернация. Това вероятно е свързано с тяхната роля за нормалното функциониране на охлювите през активния период и в процесите на хранене. Амилалитичните бактерии присъстват през целия жизнен цикъл, като

броят им е най висок през активния период. Протеолитични и целулозоразграждащи бактерии не се установяват в новоизлюпени охлюви, но в резултат на активното хранене те се откриват през активния период. Количеството на целулозоразграждащите бактерии намалява през аестивация и хибернация, докато протеолитичните бактерии най-вероятно са транзитиращи популации защото не се откриват в тези етапи. Промените в количеството, присъствието или отсъствието на една или друга група бактерии през различните етапи корелират с данните от изследването чрез ARDRA и показват, че различното физиологично състояние на охлювите се отразява върху количествения и качествен състав на чревната микрофлора на охлювите, което дава основание да се смята, че те имат съществена роля в процесите на хранене.

За изследване на биологичното разнообразие на микрофлората са изолирани общо 185 чисти бактериални култури, 63 от които Грам-отрицателни и 122 Грам-положителни. На базата на морфологични признаци Грам-отрицателните бактерии са разпределени в 15 морфологични типа, а Грам-положителните в шест.

Всички Грам-отрицателни изолати са характеризирани чрез биохимични и молекулни техники. На базата на своите биохимичните характеристики всички те, с изключение на един изолат, са ферментиращи бактерии, които принадлежат към сем. Enterobacteriaceae. Типирането на Грам-отрицателните изолати чрез молекулни техники е проведено по алгоритъм, който съчетава PCR техники, рестрикционен анализ и секвениране и включва три основни етапа. Резултатът от изпълнението на първия етап е групиране на изолатите на базата на типа на рибозомалния оперон. Вторият етап диференцира щамовете според полиморфизма на част от ITS и 23S гена. Чрез секвенирането на 16S гена, което представлява третият етап, е извършена идентификация на представители от всяка формирана група в предходните етапи. В резултат на анализирането на щамовете в първия етап, а именно амплификация на 16S/23S р ДНК интергенните участъци в рибозомалния оперон всички Грам-отрицателни изолати се разделиха в 7 ITS-групи на базата на броя и дължината на амплификационните продукти. Тъй като този анализ се препоръчва от редица автори за родово диференциране на неизвестни щамове, на този етап от нашето изследване ние допуснахме наличието на седем родови групи в микробното съобщество на охлювите. Най-много изолати (~ 72%) попадат в един от профилите, означен от нас като ITS-5.

Пет от седемте профила се оказаха специфични само за периода на аестивация, което потвърждава резултатите от предходните анализи, че микрофлората претърпява не само количествени, но и качествени промени в хода на жизнения цикъл на охлювите. На базата на този анализ е установено, че микробното разнообразие по време на активния период е по-скромно (представено само от два ITS-профила), но данните от проведените преди това количествени изследвания показват висока численост на общия брой на култивируемите бактерии. Това би могло да говори за доминираща функционална роля на тези таксони по време на този етап. Същите тези два профила присъстват през целия жизнен цикъл на охлювите, което също потвърждава тяхната съществена роля за функционирането на храносмилателния им тракт. По-нататъшното диференциране на щамовете в следващия етап на алгоритъма е амплифицирането на ДНК на щамовете с праймери T RNAIa-23S10, при което се очаква щамовете, притежаващи гена за tRNA-ala в ITS на рибозомалния оперон да формират амплификационен продукт. Такъв е формиран при всички изолати, с изключение на един. Получените амплификационни продукти са рестрицирани с две ендонуклеази *HinfI* и *TaqI*. Рестрикцията с тези ензими разкрива полиморфизъм в ITS –групите, формирани в предходния етап от изследването. Анализът на рестрикционните профили с първия ензим показва, че между щамовете в някои ITS групи съществува генетично различие, което предполага вероятно и различна видова принадлежност. Изолатите от най-голямата ITS група (ITS-5) се разделят в четири *HinfI* профили, а тези от ITS-6 - в шест. Рестрикцията с *TaqI* разкрива още по-голямо разнообразие в ITS-5 групата като формира 10 рестрикционни профила. Анализът с този ензим потвърди хомогенността на някои от получените с първия ензим групи, но разкри в същото време хетерогенността сред щамовете от други групи. Еднаквият *TaqI* профил на щамове от различни ITS групи (обикновено приемани като различни родове) и с различен *HinfI* профил показва, че за пълното диференциране на щамовете трябва да се приложат допълнителни анализи, вкл. и други ендонуклеази. По-нататъшният етап от изследването включва секвениране на 13 представителни щамове с различни ITS профили (след амплификация на спейсърния участък между 16S/23S рДНК в рибозомалния оперон) и попадащи в различни групи след рестрикция с ензимите *HinfI* и *TaqI*. На секвениране е подложен амплификационен продукт, получен с универсалните праймери 9f/1542R. Секвенирането идентифицира 10 вида, 9 от

които принадлежащи към сем Enterobacteriaceae и един от сем, Moraxellaceae. Един щам е идентифициран само до род. Сравняването на резултатите от секвенирането с тези от типиранието с предходните молекулни техники се вижда, че някои щамове с еднакви рестрикционни профили се отнасят към различни видове. Това прави невъзможно прилагането на резултатите от секвенирането към несеквенирани щамове със същите рестрикционни профили.

На базата на проведен *in silico* рестрикционен анализ на 16S рДНК с няколко ензима ние установихме, че ензимът *TaqI* има добра разграничаваща способност по отношение на видове, които не се диференцират на базата на приложения по-горе рестрикционен анализ. След проведената рестрикция на 16S рДНК с ензима *TaqI* на редица щамове и след допълнително секвениране на някои от тях ние успяхме да идентифицираме редица щамове към вече установените видове в резултат на което са генерирани специфични за тези видове рестрикционни профили, които могат да се използват при по-нататъшни таксономични изследвания като база за сравнение. В резултат от двата рестрикционни анализа (на ДНК и 16S рДНК) са идентифицирани общо 12 бактериални вида (*A. oleivorans*, *B. agrestis*, *C. gilenii*, *E. kobei*, *L. amnigena*, *K. cryocrescens*, *K. ascorbata*, *P. caratovorum*, *P. chrysanthemii*, *R. planticola*, *R. terrigena*, *R. ornitolytica*), а един изолат е идентифициран само до род (*Pantoea* sp.). Приложените техники показват, че ITS-групите не винаги обединяват щамове на ниво род и че прилагането на няколко молекулни техники, съчетано със секвениране е полезно при създаването на база данни, която да бъде използвана в сравнителни таксономични изследвания и приложена при работа с голям брой щамове.

Обект на по-нататъшни изследвания на изолираните Грам-положителни изолати са само онези 82, които притежават характеристиките на млечнокиселите бактерии. На базата на техните фенотипни характеристики ние допуснахме наличието на представители от родовете *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* и *Leuconostoc*. Началното молекулното типирание на изолатите е базирано на амплификацията на 16S/23S рДНК интергенни участъци в рибозомалния оперон с универсални праймери, в резултат на което те се обособяват в шест ITS-профила. На базата на съществуващите литературни данни ние допускаме присъствието в интестиналния тракт на охлювите на шест рода. Сравняването на данните от фенотипното характеризирание на изолатите с получените при този анализ, оправда нашите начални предположения за принадлежността на 20 от тях към

род *Lactobacillus*, тъй като те формират ITS-профил, характерен за бактериите от рода. Проведен е и още един потвърдителен родовата принадлежност анализ чрез nested-PCR, резултатите от който са положителни. Диференцирането на щамовете на рода е осъществено чрез мултиплекс PCR с групово специфични праймери, чрез който щамовете се групират на базата на полиморфизма в интергенните спейсърни участъци. Шест от изследваните от нас щамове са идентифицирани като такива, принадлежащи към т. нар. група 4, а чрез видово специфичен PCR, два от щамовете са идентифицирани като *L. plantarum*, 18 като *L. lactis* subsp. *lactis*, 4 като *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* и два щамове като *E. caseliflavus*. За избрани щамове е извършено секвениране на 16S рДНК в резултат на което е потвърдено присъствието на установените вече четири вида, споменати по-горе, и идентифицирани още видовете – *L. brevis*, *L. curvatus*, *L. taiwanensis*, *L. garviae*, *L. rafinolactis*, *L. gelidum*, *V. penali*, *E. avium*, *E. pseudoavium*, *E. gallinarum*, *E. saccharolyticum* и *W. confusa*.

На базата на култивационните методи и с прилагането на фенотипни и молекулни техники би могло да се обобщи, че в храносмилателния тракт на охлювите от вида *C. aspersum* присъстват и функционират най-малко 13 вида Грам-отрицателни бактерии и 15 вида млечнокисели бактерии от групата на Грам-положителните. Не е изключено част от неидентифицираните изолати да са нови видове, предвид малкото изследвания върху микрофлората на този вид. Култивационните подходи са полезни, тъй като те дават представа за потенциалните метаболитни възможности на видовете, въз основа на което да се правят заключения за ролята на една или друга група бактерии в храносмилателния тракт на охлювите. Чрез тях обаче се идентифицира малка част от микробните съобщества в различните екосистеми (от 1 до 10%). Разкриването на реално съществуващото биоразнообразие може да стане на базата на некултивационни подходи. Във връзка с това е проведен метагеномен анализ на тотална ДНК, изолирана от тракта на охлювите през различни етапи от жизнения им цикъл. След скриниране на получените 136 коректни клона чрез RFLP анализ с ензима *HpaII* са получени 48 рестрикционни групи, което предполага високо разнообразие на присъстващите в интестиналния тракт бактериални таксони. Сравнителният анализ на микробното разнообразие в клоновите библиотеки на новоизлюпени охлюви, такива в активно хранене и аестивация показват доминираща роля на некултивируеми представителите на

клас γ -*Proteobacteria*, като по време на аестивация представителите на този клас доминират напълно. Класът е представен от таксони, принадлежащи към сем. *Enterobacteriaceae* (родове *Citrobacter*, *Kluuyvera*, *Buttiauxella*, *Klebsiella*, *Erwinia*, *Enterobacter* и *Raoultella*) и сем. *Aeromonadaceae* (род *Aeromonas*). Метагеномният анализ разкрива разлика в качествения състав на микрофлората между охлювите, намиращи се в различни етапи от жизнения си цикъл. Представители на клас γ -*Proteobacteria*, клас *Actinobacteria* (сем. *Nocardiaceae*) и клас *Bacteroidetes* (сем. *Flavobacteriaceae*) се откриват само при новоизлюпени охлюви, а такива на клас *Fusobacteria* (сем. *Fusobacteriaceae*, род *Cetobacterium*) – само при активно хранещи се охлюви. Възможно е тези видове да осъществяват процеси, специфично протичащи само в конкретния етап.

Метагеномният анализ предоставя допълнителна информация за биологичното разнообразие на микробното съобщество в интестиналния тракт на охлювите към тази, получена чрез култивационния подход. Той се прилага за първи път в това изследване към изучаването на интестиналната микрофлора на охлювите *C. aspersum*.

Прилагането на култивационен и некултивационен подход за анализирането на микробното съобщество на храносмилателния тракт на *C. aspersum* чрез разработения от нас алгоритъм даде възможност за потвърждаването на някои данни известни до момента в специализираната литература по конкретния въпрос. Чрез него обаче, ние получихме и нова информация, отнасяща се до установяването на динамиката в количествения и качествен състав на бактериалната микрофлора в зависимост от физиологичното състояние на охлювите, както и присъствието в нея на представители на сем. *Moraxellaceae*, на видовете *L. brevis*, *L. graminis*, *L. curvatus*, *L. plantarum*, *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *L. gelidum*, *V. penali*, *W. confusa* и *R. erythropolis*.

В заключение би могло да се каже, че комбинирането на култивационен и некултивационен подход за анализирането на микробното съобщество на храносмилателния тракт на *C. aspersum* чрез разработения от нас алгоритъм даде възможност някои данни, известни до момента в специализираната литература по конкретната тема, да бъдат потвърдени и обогатени. Чрез този подход за първи път е изследвана динамиката в количествения и качествения състав на бактериалната микрофлора в зависимост от физиологичното състояние на охлювите и за първи път като компонент на бактериалното съобщество на *C.*

aspersum се откриват представители на сем. Moraxellaceae и се съобщават 10 вида Грам-положителни бактерии - *L. brevis*, *L. graminis*, *L. curvatus*, *L. plantarum*, *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *L. gelidum*, *V. penali*, *W. confusa* и *R. erythropolis* и 9 вида Грам-отрицателни бактерии - *B. agrestis*, *A. oleivorans*, *K. cryocrescens*, *K. ascorbata*, *R. planticola*, *P. carotovorum*, *P. chrysanthemii*, *E. kobei* и *L. amnigena*.

ИЗВОДИ

- 1 Разработената схема включваща PCR амплификация на 16S-23S ITS рДНК, рестрикционен анализ на ITS-23S рДНК и 16S рДНК, видово-специфичен и мултиплекс PCR, както и секвенционен анализ може да бъде прилагана за идентифициране и диференциране на интестинална микрофлора при представители на клас *Gastropoda*.
- 2 Грам-отрицателните бактерии в интестиналния тракт на *C. aspersum* принадлежат към три типа: *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* и *Fusobacteria*. Тип *Proteobacteria* е представен от два класа: γ - и β -*Proteobacteria*, като първият клас включва представители на сем. *Enterobacteriaceae*, *Aeromonadaceae* и *Moraxellaceae*. Представители на сем. *Moraxellaceae* се изолират за първи път от интестиналния тракт на *C. aspersum*.
- 3 Съставът на микробното съобщество в интестиналния тракт на *C. aspersum* се влияе от сезонната ритмика и отговаря с промяна в своя състав и структура.
- 4 Грам-положителните бактерии в интестиналния тракт на *C. aspersum* се отнасят към два типа: *Firmicutes* и *Actinobacteria*.
- 5 Видовете от род *Lactobacillus* - *L. brevis*, *L. graminis*, *L. curvatus*, *L. plantarum*, род *Leuconostoc* - *Ln. subsp. mesenteroides*, *Ln. gelidum*, род *Vagococcus* - *V. penali*, род *Weissella* - *W. confusa* и род *Rhodococcus* - *R. erythropolis*, са доказани за първи път като компонент на интестиналната микробиота на *C. aspersum*.
- 6 Представителите на клас γ -*Proteobacteria* - сем. *Enterobacteriaceae* с родове *Buttiauxella*, *Citrobacter*, *Kluyvera*, *Raoultella*, *Enterobacter*, *Lelliottia*, *Klebsiella*, *Pectobacterium*, и *Erwinia* и сем. *Aeromonadaceae* - род *Aeromonas* са доминиращи в клоновите библиотеки през всички етапи от жизнения цикъл на охлювите от вида *C. aspersum*.
- 7 Метагеномният анализ разкрива разлика в качествения състав на микрофлората между охлювите, намиращи се в различни етапи от жизнения си цикъл. Представители на клас *Actinobacteria* (сем. *Nocardiaceae*) и клас *Bacteroidetes* (сем. *Flavobacteriaceae*) са характерни само за новоизлюпените, а клас *Fusobacteria* (сем. *Fusobacteriaceae*) - за активно хранещите се охлюви.

ПРИНОСИ на дисертационния труд

- 1 Разработен е алгоритъм приложим за количествена и качествена оценка на промените в бактериалните популации от интестиналния тракт на охлювите *C. aspersum* в зависимост от етапите на тяхното развитие.
- 2 Създадена е база данни въз основа на полиморфизма на спейсърните участъци на интестинални Грам-отрицатели бактерии от сем. *Enterobacteriaceae* изолирани от охлювите *C. aspersum*, която може да се използва в сравнителни таксономични изследвания.
- 3 За първи път е приложен метагеномен и ARDRA анализ за установяване на динамиката и биоразнообразието на бактериалната микрофлора на храносмилателния тракт на охлювите от вида *C. aspersum*.
- 4 Получени са резултати, които допълват и разширяват информацията за състава и структурата на микробното съобщество в храносмилателния тракт на *C. aspersum*.
- 5 За първи път от интестиналния тракт на *C. aspersum* се доказват 10 вида Грам-положителни бактерии - *L. brevis*, *L. graminis*, *L. curvatus*, *L. plantarum*, *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *L. gelidum*, *V. penali*, *W. confusa* и *R. erythropolis* и 9 вида Грам-отрицателни бактерии - *B. agrestis*, *A. oleivorans*, *K. cryocrescens*, *K. ascorbata*, *R. planticola*, *P. carotovorum*, *P. chrysanthemii*, *E. kobei* и *L. amnigena*.

ПУБЛИКАЦИИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Кабаджожа-Христова П. Дедов И., Колева З., Мончева П. (2011) Хранителни качества на охлювите и микрофлора на техния интестинален тракт. Хранително-вкусова промишленост, 12, 31-36.
2. Koleva Z., Dedov I., Kizheva J., Lipovanska R., Moncheva P. and Hristova P. (2014) Lactic acid microflora of the gut of snail *Cornu aspersum*. *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.*, 28 (4), 1-8. (IF за 2013 0.379).
3. Koleva Z., Kizheva Y., Tishkov S., Dedov I., Kirova E., Stefanova P., Moncheva P., Hristova P. (2015) Dynamics of bacterial community in the gut of *Cornu aspersum*. *J. BioScience Biotechnology* (под печат)

УЧАСТИЕ В НАУЧНИ ФОРУМИ

1. Petia Hristova, Zdravka Koleva, Ivaylo Dedov, Valia Chipeva, Penka Moncheva. 2011. Lactic acid bacteria from the intestine of edible snail *Conu aspersum*. International Conference “Prebiotics & Probiotics - Potential for Human Health”, 18 април, 2011, Sofia, Bulgaria (постер)
2. Zdravka Koleva, Ivaylo Dedov, Joana Kizheva, Penka Moncheva, Petia Hristova. 2013. Lactic acid microflora of the gut of snail *Conu aspersum*. “Bioscience – Development and New Opportunities”, 20-22 November, 2013, Sofia, Bulgaria (постер)
3. Ivo Ganchev, Zdravka Koleva, Joana Kizheva, Penka Moncheva, Petia Hristova. 2013. Lactic acid bacteria from spontaneous fermented rye sourdough. International Conference “Bioscience – Development and New Opportunities”, 20-22 November, Sofia, Bulgaria (постер)

УЧАСТИЕ В НАУЧНИ ПРОЕКТИ

1. Договор № 059/05.04.2012 г. „Фенотипно и генотипно типирание на бактериите от род *Xantomonas*, патогени по домати”, ФНИ на СУ “ Св. Кл. Охридски”, Ръководител: проф. д-р Пенка Мончева

2. Договор № 47/19.04.2013 г. „Полифазно типирание на интестиналната микрофлора на *Cornu aspersum*”, ФНИ на СУ “ Св. Кл. Охридски”,
Ръководител: доц. д-р Петя Христова