



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

**БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ**

**КАТЕДРА „ГЕНЕТИКА“**

---

---

АНИТА БОЖИДАРОВА ГЮРОВА

**ГЕНОМНО ТИПИЗИРАНЕ НА ПРОБИОТИЧНА МИКРОФЛОРА  
ИЗОЛИРАНА ОТ НАТУРАЛНИ ПРОДУКТИ**

АВТОРЕФЕРАТ

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

Област на висше образование: „Природни науки, математика и информатика“

Професионално направление: „Биологически науки“, шифър 4.3

Научна специалност: „Генетика – Бактериална генетика и молекулно клониране“

**НАУЧНИ РЪКОВОДИТЕЛИ:**

**ДОЦ. СВЕТОСЛАВ ДИМОВ**  
Биологически факултет – София  
Катедра Генетика

**АКАД. ДРАГА ТОНЧЕВА, ДБН**  
Медицински университет – София  
Катедра по Медицинска генетика

София, 2023

## Благодарности

*По време на обучението ми в Биологически факултет към Софийски университет „Св. Климент Охридски“ имах привилегията да работя с изключителни специалисти, които ми предоставиха неоценима помощ в работата.*

*Изразявам огромната си благодарност на моите научни ръководители АКАД. ДРАГА ТОНЧЕВА, ДБН, Ръководител на Катедра по Медицинска генетика, Медицински университет, София и ДОЦ. СВЕТОСЛАВ ДИМОВ, Ръководител на Катедра „Генетика“, Биологически факултет към Софийски университет „Св. Климент Охридски“ за ценните ръководни съвети и напътствия в разработването на настоящият дисертационен труд. Благодаря за гласуваното ми доверие и предоставената ми възможност за обучение в рамките на Биологически факултет – гр. София, както и за възможността да усвоя и прилагам най-съвременните подходи и методи в генетиката и геномиката.*

*Изказвам най-сърдечната си признателност на целият екип на Катедра „Генетика“ за подкрепата, насоките и топлото отношение.*

*Благодаря Ви, че бяхте до мен винаги когато имах нужда от Вас!*

*Бих искала да изкажа своята благодарност и към жителите на с. Черни Вит за запазването на традицията в производството на българското зелено сирене, както и за предоставянето на партиди за анализи.*

Проектът на дисертационен труд съдържа 231 страници, 32 фигури и 17 таблици.

Цитирани са 452 литературни източника и 6 електронни източника.

Включените в дисертационният труд изследвания са извършени в Катедра „Генетика“, Биологически факултет, Софийски университет „Св. Климент Охридски“.

Изследването на пчелният микробиом беше финансирано от Фонд научни изследвания под номер КП-06-Н26/8 от 17.12.2018 г.

Изследването на зеленото сирене беше извършено в рамките на финансиране № 80-10-27 / 18.03.2020 г. на Софийски университет “Св. Климент Охридски”.

Дисертационният труд е насрочен за защита пред научно жури в състав:

Вътрешни членове на научно жури:

1. ...
2. ...

Външни членове на научно жури:

1. ...
2. ...
3. ...

Защитата на дисертационният труд ще се състои на..... г. от..... часа.

Материалите по защитата са на разположение в Катедра „Генетика“ на Биологически факултет към Софийски университет „Св. Климент Охридски“.

## **СЪДЪРЖАНИЕ**

<b>СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ.....</b>	<b>5</b>
<b>ВЪВЕДЕНИЕ .....</b>	<b>6</b>
<b>ЦЕЛ И ЗАДАЧИ .....</b>	<b>8</b>
<b>МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ.....</b>	<b>10</b>
<b>РЕЗУЛТАТИ .....</b>	<b>12</b>
<b>ОБСЪЖДАНЕ .....</b>	<b>48</b>
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	<b>68</b>
<b>ОБОБЩЕНИЕ НА ПОСТИГНАТИТЕ РЕЗУЛТАТИ.....</b>	<b>70</b>
<b>ИЗВОДИ.....</b>	<b>71</b>
<b>ПРИНОСИ.....</b>	<b>73</b>
<b>ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....</b>	<b>74</b>
<b>БИБЛИОГРАФИЯ.....</b>	<b>75</b>

## СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ

### НА КИРИЛИЦА:

**ДНК** – Дезоксирибонуклеинова киселина

**МКБ** – Млечнокисели бактерии

**ПВР** – Полимеразна верижна реакция

**ОТЕ** – Оперативна таксономична единица

### НА ЛАТИНИЦА:

**AAI** (Amino Acid Identity) – Средна аминокиселинна идентичност

**AFB** (American Foulbrood Disease) – Заболяване Американски гнилец

**ANI** (Average Nucleotide Identity) – Средна нуклеотидна идентичност

**BLAST** (Basic Local Alignment Search Tool) - Основен инструмент за търсене на локално подравняване

**bp** (base pair) - базови двойки

**CFU** (Colony Forming Unit) – единици образуващи колонии на грам

**EUCAST** (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) - Европейски комитет за тестване за антимикробна чувствителност

**MLST** (Multilocus Sequence Typing) – Типизиране на мултилокусни последователности

**NGS** (Next Generation Sequencing) – Секвениране от следващо поколение

**RAPD** (Random Amplification of Polymorphic DNA) - Случайно амплифициране на полиморфна ДНК

**UPGMA** (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) - Групов метод на непретеглена двойка със средно аритметично

## ВЪВЕДЕНИЕ

Съвременният човек обръща все по-голямо внимание на съдържанието на храната, която консумира, като се стреми да избягва химическите добавки и вкусовете подобрители. Приложението на млечнокиселите бактерии при разработването на нови пробиотични и функционални храни непрекъснато се увеличава (Biscola et al., 2016). Все повече усилия в световен мащаб се насочват към разработване на биоинформатични и молекулярни методи за анализ и геномно типизиране на различни микроорганизми. Особен интерес представлява диференцирането им както по отношение на тяхната патогенност и антибиотична резистентност, така и по отношение на техните антимикробни свойства.

Увеличаващия се брой електронни платформи за извършване на биоинформатичен анализ, както и нарастващия брой свободно достъпни бази данни, предоставят възможност за характеризирание, статистически анализ и предвиждане на възможности за потенциално индустриално приложение на различни бактериални щамове. В базите данни са налични хиляди публично достъпни геноми (Fleischmann et al., 1995). Голяма част от тези геноми са получени от млечнокисели бактерии, използвани като пробиотици или начални култури при хранителна ферментация (Klaenhammer, Altermann, Arigoni, Bolotin, & Breidt, 2002; Lukjancenko, Ussery, & Wassenaar, 2012). Ускореното развитие в последните години на съвременните научни направления като функционална геномика, транскриптомика и протеомика спомогнаха за напредъка в изследванията по отношение на взаимодействията между пробиотиците и гастроинтестиналния тракт.

В настоящият дисертационен труд бе поставена цел за изолиране и таксономично характеризирание на млечнокисели бактерии както от традиционни за България, естествено ферментирали продукти, така и от пчелни продукти, добити в различни екологични региони на страната. Събраната колекция от изолати беше тествана за антибактериална активност, като щамовете с установено наличие на такава срещу патогенни микроорганизми бяха определени таксономично чрез класически и молекулярно-генетични методи. В допълнение, най-перспективните изолати бяха анализирани на геномно ниво чрез прилагането на новогенерационно секвениране (NGS – Next Generation Sequencing). Получените резултати бяха обработени и допълнително анализирани чрез свободно достъпни веб-базирани инструменти. По този начин извършихме оценка на потенциала на

млечнокиселите бактерии за продуциране на бактериоцини, които служат като естествени агенти срещу бактериални инфекции.

Особено внимание заслужава извършеното от нас NGS-базирано метагеномно изследване на традиционното българско зелено сирене, произведено в с. Черни Вит. Това е първото по рода си научно изследване на този уникален млечен продукт. Резултатите ни показват, че българското зеленото сирене притежава изключително богат микробиом, както и единствената българска благородна плесен. Органолептичните му характеристики са обусловени от специфичния регион в който се произвежда, като производството му може да се счита за национално културно наследство.

В сглобените геноми на избрани МКБ, изолирани от пчелните продукти, беше установено наличие на гени на бактериоцини, които са възможно обяснение за антимикробните свойства на тези изолати. Проучванията ни показаха, че някои от изследваните от нас щамове от р. *Enterococcus faecium* притежават антибактериална активност срещу патогена по медоносните пчели *Paenibacillus larvae* и служи като естествена защита на кошерите. Бактерията *Paenibacillus larvae* причинява заразното заболяване Американски гнилец (AFD – American foulbrood disease), което се характеризира с висока смъртност по пчелните семейства и засяга множество кошери по целия свят.

NGS-базираният подход се оказва много икономичен, бърз и ефективен начин за скрининг на приложимостта на нови про- и пребиотични щамове. Анализираният от нас млечнокисели бактерии, част от микробиома на естествено ферментирани и пчелни продукти, притежават благоприятен ефект върху човешкото здраве и здравето на пчелите, оказвайки предпазващо въздействие срещу патогенни микроорганизми. Получените данни са интересни както от научна, така и от практическа гледна точка, не само поради връзката на млечнокиселата ферментация и дълголетието на българското население, но и поради факта, че медоносните пчели са много важен биологичен ресурс с голямо икономическо значение и застрашаването на тяхната популация може да даде отражение върху земната екосистема като цяло.

## ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Основната цел на настоящото изследване е молекулярно-генетичното и геномното характеризиране на щамове микроорганизми, изолирани от функционални храни и пчелни продукти, както и изследване на микробиотата на функционалните храни и пчелните продукти с помощта на методи, основаващи се на новогенерационно секвениране.

За нейното осъществяване бяха поставени следните **експериментални задачи**:

1. Събиране на колекция от бактериални изолати от ферментирали функционални храни (кисели млека, сирена, колбаси, ферментирали зеленчуци и закваски за теста);
2. Събиране на колекция от бактериални изолати от пчелни продукти и гастроинтестинален тракт на медоносни пчели;
3. Скрининг на колекциите за протеазни и пептидазни активности спрямо млечни белтъци;
4. Скрининг на колекциите за антибактериална активност, дължаща се на синтез на бактериоцини, включващ доказване на белтъчната природа на антибактериалния агент, определяне на спектъра и титъра на антибактериалната активност, както и факторите на средата, оказващи влияние върху нейната експресия;
5. Фенотипно родово и видово определяне на подбрани щамове показващи пробиотичен потенциал;
6. Точно видово определяне на подбрани щамове показващи пробиотичен потенциал с помощта на молекулярно-генетични методи включващи: родово-специфични ПВР, видово-специфични ПВР и секвениране на гените, кодиращи 16S рРНК на автоматичен секвенатор;
7. Изолиране на висококачествена тотална ДНК от подбрани щамове с пробиотичен потенциал, с цел, цялостно геномно секвениране;
8. Изолиране на висококачествена тотална ДНК от някои хранителни и пчелни продукти, както и гастроинтестинален тракт на медоносни пчели, с цел, провеждане на ампликон-базирани метагеномни изследвания на състава на микробиотите;
9. Изследване на степен на филогенетично родство на някои щамове показващи пробиотичен потенциал с помощта на RAPD анализ.



10. Биоинформатична обработка на данните от цялостното геномно новогенерационно секвениране на геномите на някои щамове показващи пробиотичен потенциал с тяхното асемблиране;
11. Биоинформатичен анализ на данните от асемблираните геноми, с цел, точно видово определяне и MLST типизиране,
12. Биоинформатичен анализ на данните от асемблираните геноми, с цел, скрининг за наличие на гени, обуславящи експресията на бактериоцини;
13. Биоинформатичен анализ на данните от асемблираните геноми, с цел, проверка за наличие на гени, обуславящи антибиотични резистентности, фактори на вирулентност и фактори за патогенност, с цел, доказване на безопасността на изолираните щамове;
14. Биоинформатична обработка на данните от ампликон-базираното метагеномно новогенерационно секвениране, с цел, оценка на качеството на секвенирането;
15. Биоинформатична обработка на данните от ампликон-базираното метагеномно новогенерационно секвениране на някои проби, с цел, аотиране на операционните таксономични единици и изследване на състава на микробиотите;
16. Биоинформатична обработка на данните от ампликон-базираното метагеномно новогенерационно секвениране на някои проби, с цел, анализ на алфа-разнообразието;
17. Биоинформатична обработка на данните от ампликон-базираното метагеномно новогенерационно секвениране на някои проби, с цел, анализ на бета-разнообразието.

## **МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ**

### **1. Бактериални щамове, среди и условия на култивиране.**

Колекция от 368 бр. щамове млечнокисели бактерии беше изолирана от 31 бр. естествено ферментирали млечни продукти (кашкавал, зелено сирене и домашни сирена произведени от краве, козе, биволско или овче мляко), месни продукти (луканка, суджук и сух салам), закваска за хляб, кисело зеле, маслини и пчелни продукти (пчелен прашец, перга и пчелно чревно съдържимо).

#### **1.1. Дългосрочно съхранение на щамове**

Трайните култури бяха изготвени в 10% сухо мляко и съхранявани при  $-20^{\circ}\text{C}$  в продължение на три месеца, като тяхната жизнеспособност беше проследявана чрез периодични посевания на течна и твърда среда.

### **2. Микробиологични методи и техники**

2.1. Методи за изолиране на щамове млечнокисели бактерии от различни продукти

2.2. Култивиране върху специфични среди

### **3. Техники за скрининг на колекцията за изолати, показващи пробиотичен потенциал.**

3.1. Методи за скрининг за антибактериална активност.

3.2. Методи за скрининг за протеолитична активност.

### **4. Видово определяне на изолатите, показващи пробиотичен потенциал**

4.1. Физиологични и биохимични методи.

4.2. Молекулярно-генетични методи.

4.2.1. Родово-специфична ПВР.

Амплификация с двойката праймери за ентерококи Ent1/Ent2.

4.2.2. Видово-специфична ПВР.

Намножаване със специфични за *Enterococcus faecalis* праймери (EDAI\_FI/EDA I\_RI) и праймери за *Enterococcus durans* (DU1/DU2).

4.2.3. Секвениране на гените, кодиращи 16S рРНК.

### **5. Техники за доказване на белтъчната природа на антибактериалните агенти**

6. **Техники за определяне на спектъра на активност на антибактериалните агенти.**
7. **Техники за определяне на титъра на бактериоцинова активност.**
8. **Техники за определяне на факторите, влияещи върху експресията на бактериоцини**
9. **Методи за изследване на белтъчно съдържание**
10. **Методи за изолиране на нуклеинови киселини**
11. **Електрофоретични методи**
12. **Молекулярно-генетични техники**
13. **Методи за секвениране**
14. **Метагеномни изследвания**
15. **Мултилокусно секвенционно типизиране**
16. **Тестове за наличие на антибиотична резистентност и фактори на вирулентност**
17. **Методи за изследване на филогенетично родство**
18. **Използвани софтуерни продукти**

GeneTools (Syngene), QIIME, Galaxy, LefSe, R, mothur, WGCNA, FLASH, BAGEL 4, PlasmidFinder 2.1, QUASt, ResFinder 3.2, KmerResistance, VirulenceFinder 2.0, Shovill, MUSCLE, Uchime, UPARSE.

## РЕЗУЛТАТИ

### 1. Микробни изолати от пчели

#### 1.1. Изготвяне на колекция от изолати

Колекция от 45 щамове, основно принадлежащи към род *Enterococcus*, беше събрана от 15 кошера от различни пчелини, разположени в гр. София, гр. Видин, с. Душанци и с. Момчиловци. Работихме със свежо събрани поленови гранули, поради факта, че те са в контакт със слюнката на пчелите, която от своя страна е във взаимовръзка със стомашно-чревния тракт. Използвахме селективна среда D-coccosel за вид *Enterococcus* при изолатите добити от всичките петнадесет кошера. Изолатите от всяко едно пчелно семейство бяха култивирани в 15 петриеви панички със селективната твърда хранителна среда D-Coccosel агар. Общият брой на колонии варираше между 12 и 37 на петри, като черните колонии бяха в диапазона между 3 и 17. Изолирането на единични колонии беше извършено на база наличие на черен ореол около бактериалната колония. На случаен принцип бяха подбрани по три колонии с ясно изявен такъв ореол от всяка една петриева паничка. На тези изолати бяха присвоени уникални номера, кодиращи следната фактология – първите две цифри кореспондират с конкретният пчелен кошер от който произхождат (от 01 до 15), докато третата цифра се отнася към поредността на произволно подбраната колония. Молекулярно-генетичните изследвания на изолатите разкриха, че един и същи щам присъства в четири от шестте кошера, който беше определен като *E. durans* и наименован EDD2. В другите два кошера също бяха открити представители на род *Enterococcus*, които бяха съхранени без да им се извършва допълнително определяне.

Всички щамове, изолирани от пчелни семейства и с предполагаема принадлежност към род *Enterococcus*, са представени в табл. № 1.

**Таблица № 1** – Списък на изолатите от пчелни кошери принадлежащи към род *Enterococcus* и някои от техните характеристики

Изолат	Активност срещу <i>Paenibacillus larvae</i>	Специфична ПВР за род <i>Enterococcus</i>	Специфична ПВР за <i>Enterococcus durans</i>	Специфична ПВР за <i>Enterococcus faecalis</i>
01-1	No	+	-	+
01-2	No	+	-	+

Изолат	Активност срещу <i>Peanibacillus larvae</i>	Специфична ПВР за род <i>Enterococcus</i>	Специфична ПВР за <i>Enterococcus durans</i>	Специфична ПВР за <i>Enterococcus faecalis</i>
01-3	No	+	-	-
02-1	Yes	+	+	-
02-2	Yes	+	+	-
02-3	No	+	-	+
03-1	No	+	-	+
03-2	No	+	-	+
03-3	Yes	+	-	-
04-1	No	+	-	+
04-2	No	+	-	+
04-3	No	+	-	-
05-1	No	+	-	+
05-2	No	+	+	-
05-3	No	+	-	+
06-1	No	+	-	+
06-2	No	+	-	-
06-3	No	+	+	-
07-1	No	+	-	-
07-2	No	+	-	+
07-3	No	+	-	+
08-1	Yes	+	+	-
08-2	Yes	+	+	-

Изолат	Активност срещу <i>Peanibacillus larvae</i>	Специфична ПВР за род <i>Enterococcus</i>	Специфична ПВР за <i>Enterococcus durans</i>	Специфична ПВР за <i>Enterococcus faecalis</i>
08-3	Yes	+	+	-
09-1	Yes	+	-	-
09-2	No	+	-	-
09-3	No	+	-	-
10-1	No	+	+	-
10-2	No	+	-	-
10-3	No	+	-	+
11-1	Yes	+	+	-
11-2	No	+	-	-
11-3	No	+	-	+
12-1	No	+	-	-
12-2	No	+	-	-
12-3	No	+	-	+
13-1	No	+	-	+
13-2	No	+	-	+
13-3	No	+	-	-
14-1	No	+	-	+
14-2	No	+	-	-
14-3	Yes	+	+	-
15-1	No	+	-	-
15-2	No	+	-	+

Изолат	Активност срещу <i>Paenibacillus larvae</i>	Специфична ПВР за род <i>Enterococcus</i>	Специфична ПВР за <i>Enterococcus durans</i>	Специфична ПВР за <i>Enterococcus faecalis</i>
15-3	No	+	+	-

### 1.2. Извършване на предварително видово определяне

Средата D-coccosel е доказана като селективна за видовете от род *Enterococcus*, първоначално известни като група D-стрептококи (Facklam & Moody, 1970). Независимо от тази първоначална селекция на изолатите, извършихме допълнителни таксономични анализи на колекцията от щамове. За целта, приложихме различни биохимични и физиологични методи, както и молекулярни тестове на основата на ДНК последователности. Всички четиридесет и пет анализирани щамове демонстрираха интензивен растеж в присъствие на 6,5% NaCl, както и при ниски (10°C) и високи (45°C) температури.

С помощта на ПВР с родо-специфични праймери беше потвърдена принадлежността на изолатите към род *Enterococcus*, докато посредством видово-специфични олигонуклеотиди беше установено, че единадесет от тях принадлежат към вид *Enterococcus durans* (сред които седем притежаващи активност срещу *Paenibacillus larvae*, по-късно показали клонална свързаност и определени като EDD2), а деветнадесет – към вид *Enterococcus faecalis* (нико един от тях не показва активност срещу *Paenibacillus larvae*). Петнадесетте останали щамове бяха успешно определени само до ниво родова принадлежност (сред тях два с демонстрирана активност срещу *Paenibacillus larvae*).

### 1.3. Активност срещу *Paenibacillus larvae*

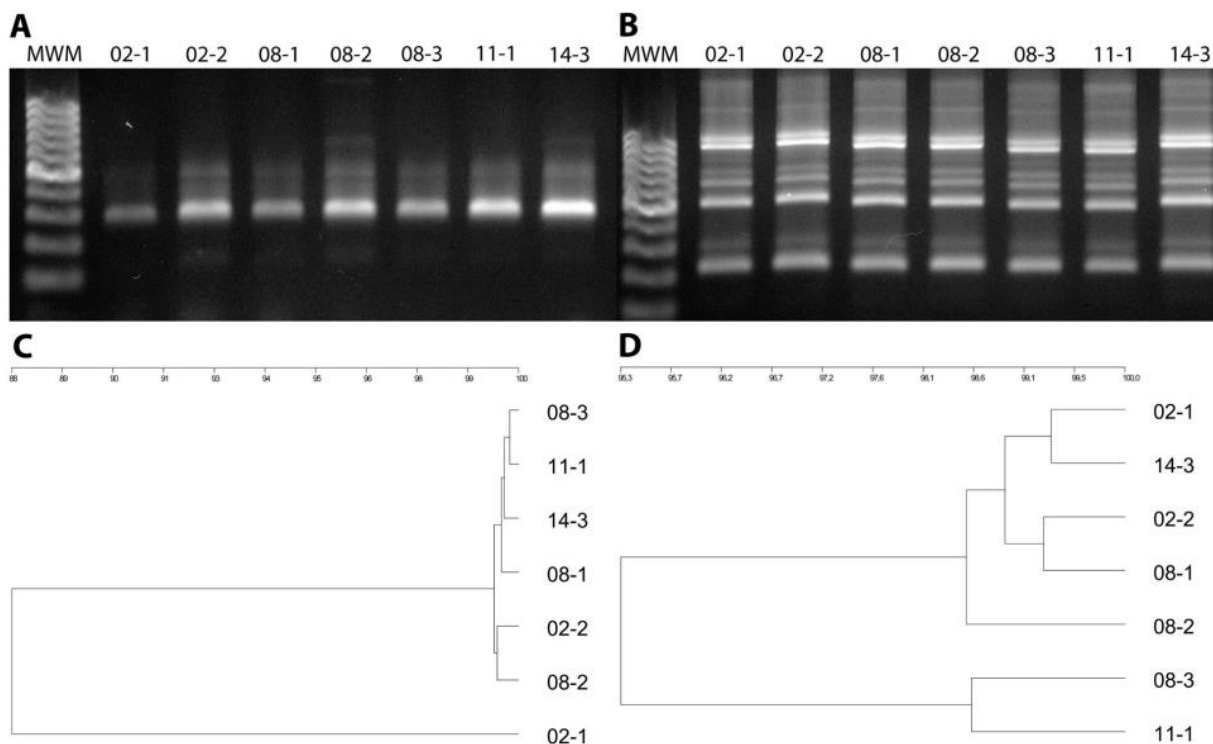
От всички изследвани пчелни изолати бяха изготвени култури в течна хранителна среда, а в следствие от тях бяха получени неутрализиращи супернатанти. Те на свой ред бяха тествани за наличие на инхибиторна активност срещу бактериалния патоген по пчелите *Paenibacillus larvae* чрез прилагане на ямково-дифузионния метод. Благодарение на този експеримент установихме, че единадесет изолата секретират в растежната среда компоненти, инхибиращи растежа на тестовия микроорганизъм. Това беше визуализирано чрез наблюдаването на чисти зони на инхибиране около съответните ямки с накупани

неутрализираните супернатанти. Белтъчната природа на така идентифицираните антимикробни агенти беше доказана чрез наблюдаването на загуба на активност при третиране с ензима протеиназа К. Съпоставянето на така идентифицираните бактериоцин-продуциращи изолати с предходните ни данни относно таксономичния статус показва, че седем от деветте щамове принадлежат към вид *Enterococcus durans* и два принадлежат на *Enterococcus faecium*. Останалите два не образуват продукти при видово-специфичните ПВР, използвани в нашето изследване. За бъдещите ни проучвания, избрахме да се фокусираме върху деветте изолата с изяснена видова принадлежност, които произхождат от четири различни пчелни кошера.

#### 1.4. Проверка за наличие на клонална свързаност между щамовете продуценти на бактериоцини

Поради факта, че в два от четирите кошера няколко изолата бяха характеризирани като *Enterococcus durans*, допуснахме, че може би имаме няколко изолата от един и същи щам. За да проверим тази хипотеза, подложихме на RAPD анализ с различни праймери всички седем щамове, проявяващи активност срещу *Paenibacillus larvae*. Резултатите са показани на фиг. 1. С помощта на праймер L2 беше постигнато по-голямо разграничение (Панели А и С) с по-нисък най-малък коефициент на сходство (88%). По-плътен електрофоретичен мотив беше постигнат с праймер E1, но с по-висок най-малък коефициент на сходство (95,3%) – панели В и D. Въпреки това и в двата случая най-малките коефициенти на сходство бяха много над официално допустимите за наличие на клонална свързаност, чиито диапазон варира между 70% и 75% (Grundmann et al., 1997; Webster et al., 1996). Вследствие на тези получени резултати, ние заключихме, че изолатите *Enterococcus durans* принадлежат на един и същи щам, който е разпространен между кошерите. Щамът беше наименован на първият кошер от който беше открит – EDD2 (*Enterococcus durans* от Душанци, кошер № 2).





**Фигура № 1** – RAPD анализ

RAPD анализ извършен с праймери L2 (Панели А и С) и E1 (Панели В и D). Панели А и В онагледяват резултатите от протекла електрофореза с праймери L2 и E1 (MWM е ДНК маркер със стъпка между размерите на фрагментите от 100 базови двойки, докато изолатите са представени с номера). Панели С и D отразяват UPGMA дендрограмите, получени с праймери L2 и E1.

### 1.5. Молекулярно и фенотипно охарактеризиране на щам EDD2 принадлежащ към *Enterococcus durans*

Първа стъпка в охарактеризирането на щам EDD2 беше потвърждаването на неговия таксономичен статус. За целта, беше анализирана последователността на 16S рибозомалния локус чрез секвениране по Sanger. Получените секвенции (GenBank ID: MN865967.1) потвърдиха резултатите от проведените ПВР с използването на видово-специфични праймери за *Enterococcus durans* DU1/DU2, като изолатът потвърдено принадлежи към този вид. Чрез провеждане на ПВР с праймери, таргетиращи гени за антибиотична резистентност установихме, че при изследваният от нас щам липсват генетични детерминанти за устойчивост към ванкомицин *vanA*, *vanB*, *vanC1* и *vanC2*. Аналогична проверка за фактори на вирулентност не установи наличието на гени, кодиращи хиалуронидаза, желатиназа и

колаген-свързващ белтък. Устойчивостта на щам EDD2 срещу антибиотици беше изследвана и фенотипно. За целта, беше изготвена антибиограма по диск-дифузионния метод. Отчетените резултати демонстрираха, че щам EDD2 проявява чувствителност към следните антибиотици: ампицилин (зона на инхибиране с диаметър 30 мм.), имипенем (32 мм.), гентамицин (25 мм.), ципрофлоксацин (24 мм.), левофлоксацин (26 мм.), ванкомицин (22 мм.), тейкопланин (21 мм.), линезолид (27 мм.) и тигециклин (20 мм.) (табл. 2), и категорично показват липсата детерминанти на резистентност в щам EDD2.

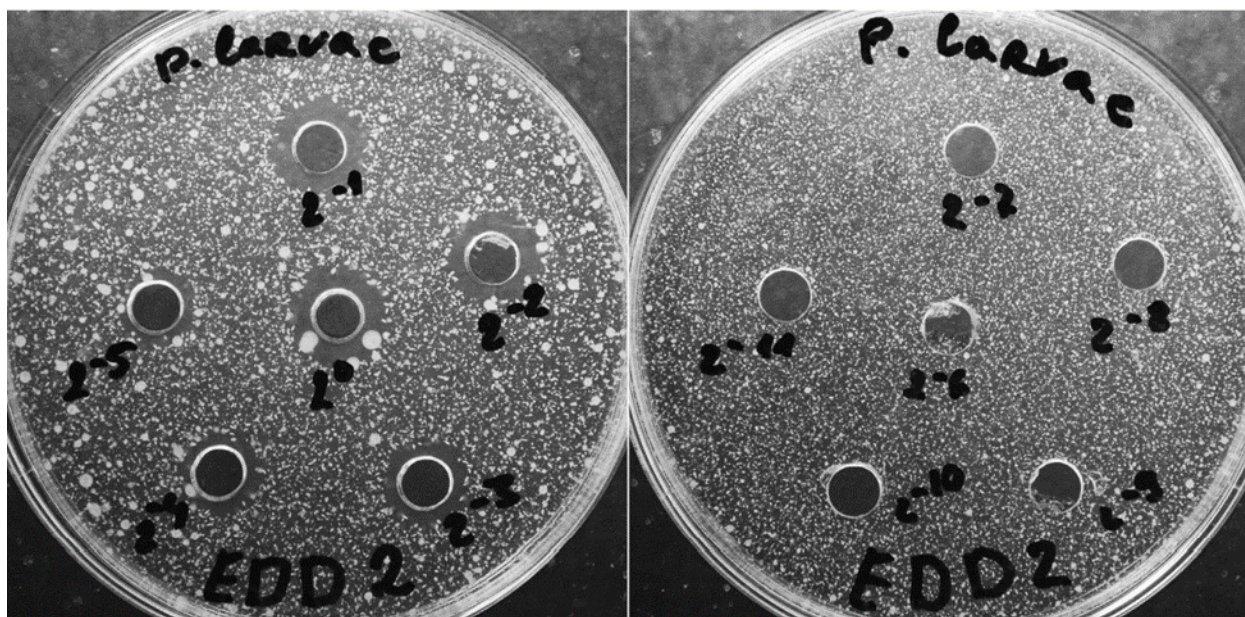
Таблица № 2 – Резултати от антибиограма

№	Антибиотик	Резултат (зона на инхибиране в мм.)
1	Ampicillin	S (30)
2	Ciprofloxacin	S (24)
3	Erythromycin	S (23)
4	Gentamicin	S (25)
5	Imipenem	S (32)
6	Levofloxacin	S (26)
7	Teicoplanin	S (21)
8	Vancomycin	S (22)
9	Linezolid	S (27)
10	Norfloxacin	S (21)
11	Tigecycline	S (20)

Легенда: S – податлив (*susceptible*), I – средно устойчив (*intermediate resistant*), R – устойчив (*resistant*). Резултатите бяха интерпретирани съгласно препоръките на Европейския комитет за тестване на антибиотична чувствителност (EUCAST) 2019.

#### 1.6. Проява на антимикробна активност на щам EDD2 срещу *Paenibacillus larvae*

Резултатите от антибактериалната инхибиторна активност на *Enterococcus durans* EDD2 срещу *Paenibacillus larvae* бяха демонстрирани с помощта на агар-ямковия метод (фиг. 2), както е описано в раздел Материали и методи. Антибактериалната бактериоцинова активност беше измерена с използването на арбитрарни единици за мл. (AU/ml) чрез извършване на двукратни серийни разреждания. Една арбитрарна единица представлява най-високото разреждане при което има наличие на забележима зона на инхибиране. Активността беше калкулирана на 640 AU/ml.



Фигура № 2 – Инхибиторна активност на щам *Enterococcus durans* EDD2 срещу *Paenibacillus larvae*.

За изчисляване на инхибиторната активност на супернатантата в арбитрарни единици на мл. са използвани двукратни серийни разреждания.

#### 1.7. Характеризиране на продуцираните от *Enterococcus durans* EDD2 бактериоцини, проявяващи активност срещу *Paenibacillus larvae*

За изследване на продуцираните от *Enterococcus durans* EDD2 бактериоцин/и се спряхме на подход, базиран на биоинформатичен анализ на геномната последователност на въпросният изолат.

За целта, първоначално секвенирахме неговият геном чрез технологията от второ поколение с къса рамка на четене на Illumina. Получените данни от секвенирането бяха анализирани с помощта на web платформата Galaxy (Afgan et al., 2018). Рийдовете бяха пре-процесирани и асемблирани чрез интегрираният софтуер Shovill. Полученият резултат се състоеше от 139 контига с размер по-голям от 500 бд (най-големият контиг беше 155 300 бд). Получената финална драфт геномна секвенция на *Enterococcus durans* EDD2 се състоеше от 2 961 262 бд и имаше средно съдържание на GC от 37,71% (стойности типични за вида). С помощта на платформата BAGEL (de Jong, van Heel, Kok, & Kuipers, 2010) потърсихме в генома наличие на бактериоцинови генетични детерминанти. Чрез този анализ идентифицирахме два предполагаеми клъстера сходни на enterocin L50A/L50B (фиг. 3) и enterocin P (фиг. 4), локализиращи съответно на контиг 48 и контиг 49. Както може да

се види на фиг. 10, отворените рамки на четене локализирани на контиг 48 на аминокиселинно ниво са идентични на последователностите на L50A и L50B. За разлика от тях, бактериоциноподобните последователности на контиг 79 показаха на аминокиселинно ниво 93% сходство с описаната в литературата секвенция на enterocin P.

```

                                - 35 box
19541 GCATAAATATATATTTTGTCAAATATTTTT TTGTTT TTGTGTGA
                                - 10 box                                RBS
19586 TATACAAT TATTAT GAACAAAAAATGATT GGAGGAGTTATATT
L50A
Start
19631 ATGGGAGCAATCGCAAAATTAGTAGCAAAGTTGGGTGGCCTATT
      M G A I A K L V A K F G W P I

19676 GTTAAAAAATATTACAACAAATTATGCAGTTTATTGGAGAAGGA
      V K K Y Y K Q I M Q F I G E G
                                Stop
19721 TGGGCAATTAACAAAATCATTGAGTGGA TAAAAACATATT TAA
      W A I N K I I E W I K K H I *

L50 B
Start
19785 ATGGGAGCAATCGCAAAACTAGTGACAAAGTTGGGTGGCC ACTA
      M G A I A K L V T K F G W P L

19831 ATCAAAAAATCTACAACAAATCATGCAATTTATTGGACAAGGA
      I K K F Y K Q I M Q F I G Q G
                                Stop
1987 6 TGGACAATAGATCAAATTGAAAAATGGCTAAAAAGACAT TAATGT
      W T I D Q I E K W L K R H *

```

**Фигура № 3** - Секвенции на L50A и L50B, които бяха открити в контиг 48.

Фигурата представлява нуклеотидна последователност съдържаща структурни гени на Ent50A (entL50A) и EntL50B (entL50B). Всички позиции са дадени съответстващи на контиг 48. Съответстващата аминокиселинна последователност на EntL50A и EntL50B са показани под последователността на ДНК. Предполагаемите два промоторни панела на -35 и -10 позиция и рибозомния свързващ сайт са подчертани. Двете белтъчни последователности са напълно сходни с описаните от Cintas и съавтори (L. M. Cintas et al., 1998).

Най-забележителната разлика беше старт кодона АТТ, който открихме в генома на *Enterococcus durans* EDD2. Чрез допълнителна ръчна проверка потвърдихме наличието на предполагаеми -10 и -35 промоторни секвенции, както и рибозомен свързващ сайт в началото на отворената рамка на четене (фиг. 4).

A)

```

                                     - 35 box
3948 TATGCTTTCAAAAAAАСТТТТТATGATATAA  TTATCA AATTTTC
                                     - 10 box          RBS
3903 TGAAAATTATT TATAAT TATTTTAGAAA  AAAGGAGGTATTGATTT
      Start
3858 TTT ATT AGAAAAAAATTATTTAGTTTAACTCTTATTGGAAAGTTT
      M R K K   L F S L T L I G K F
3813 GGATTAGTTGTGACGAATTTTGGTACAAAAGTTGATGCAGCTACG
      G L V V T N F G T K V D A A T
3768 CGTTCATATGATAATGGTATTTATTGTAATAATAGTAAGTGCTGG
      R S Y D N G I Y C N N S K C W
3723 GTTAACTGGGGAGAAGCTAAAGAAAATATTGCAGGAATTGTTATT
      V N W G E A K E N I A G I V I
                                     Stop
3678 AGTGGCTGGGCTTCTGGCTTGGCAGGTAT GGGACATTAATATCCT
      S G W A S G L A G M G H          *
```

B)

Ent_P EDD2	1	MRKKLFSL TLIG KFGLVVTNFGTKVDAATRSY	DNGIYCNNNSKCWV	45
		MRKKLFSL LIG FGLVVTNFGTKVDAATRSY	NG+YCNNSKCWV	45
Ent erocin	P 1	MRKKLFSL ALIG I FGLVVTNFGTKVDAATRSY	GNGVYCNNNSKCWV	45
Ent_P EDD2	46	NWGEAKENIAGIVIS GWASGLAGMGH	71	
		NWGEAKENIAGIVISGWAS	GLAGMGH	
Ent erocin	P 46	NWGEAKENIAGIVISGWASGLAGMGH	71	

**Фигура № 4** - Последователност сходна на enterocin P локализирана на контиг 79.

**Панел А:** Нуклеотидна последователност на структурния ген на Enterocin P (entP), открита в изолат *Enterococcus durans* EDD2. Всички позиции са дадени в съответствие с контиг 79. Кодираната от enterocin P аминокиселинни последователности са показани под ДНК последователността.. Предполагаемите два промоторни панела на -35 и -10 позиция и рибозомния свързващ сайт са подчертани. Всички тези регулаторни последователности са идентични с описаните от Cintas и съавтори (L. M. Cintas et al., 1998). **Панел В:** Подравняване на две последователности на enterocin P генерирани от BLASTp. Ent\_P EDD2 е новият предполагаем бактериоцин открит в *Enterococcus durans* EDD2. Последователността на enterocin P е взета от Cintas и съавтори (Cintas, Casaus, Havarstein, Hernandez, & Nes, 1997). Всички несходни аминокиселини са подчертани.

Впоследствие, асемблираният геном беше анализиран за наличие на генетични детерминанти за бактериоцинова продукция, както и за плазмидни начала на репликация със софтуерните инструменти BAGEL4 и PlasmidFinder. На контиг 48 от драфт-геномната секвенция бяха открити последователности, сходни на кодиращите ентероцини L50A и L50B (локус тагове G4V64\_11725 и G4V64\_11730). На контиг 79 беше открита последователност, аналогична на кодиращата секвенция на enterocin P (локус таг G4V64\_13395). Асемблираният геном е публично достъпен в GenBank под номер за достъп ASM1097499v1. В табл. 3 е показано обобщение на получените основни геномни показатели и метрики с помощта на софтуерът QUAST, част от онлайн-базираната платформа със свободен достъп Galaxy (Afgan et al., 2018). В допълнение, на същия контиг беше открито и плазмидно начало на репликация. Тези резултати са представени в табл. 4.

**Таблица № 3** – Обобщение на резултатите получени от NGS анализа на *Enterococcus durans* EDD2 по отношение на геномните метрики

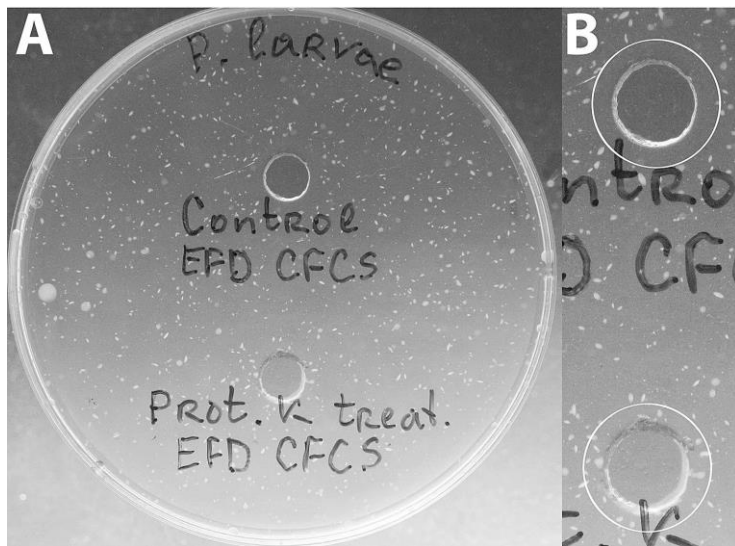
Вид анализ	Стойност	Използвани инструменти	Референтни статии
Брой контиги по-големи от 500 бд	139 бр.	Софтуер QUAST интегриран в платформата Galaxy	(Afgan et al., 2018)
Най-дълъг контиг	155 300 бд	Софтуер QUAST интегриран в платформата Galaxy	(Afgan et al., 2018)
Финален размер на драфт генома	2 961 262 бд	Софтуер QUAST интегриран в платформата Galaxy	(Afgan et al., 2018)
GC съдържание	37,71%	Софтуер QUAST интегриран в платформата Galaxy	(Afgan et al., 2018)
Открити аналози на бактериоцинови генетични 3детерминанти	Enterocin L50A/L50B на контиг 48 Enterocin P на контиг 79	BAGEL4 платформа	(de Jong et al., 2010)
Открити начала на репликация на плазмиди	Rep2 на контиг 79	Софтуер PlasmidFinder	(Carattoli et al., 2014)

**Таблица 4** - Обобщение на резултатите получени от NGS анализа на *Enterococcus durans* EDD2 по отношение на анализите за бактериоцини и плазмиди

Вид анализ	Стойност	Използвани инструменти	Референтни статии
Открити аналози на бактериоцинови генетични детерминанти	Enterocin L50A/L50B на контиг 48 Enterocin P на контиг 79	BAGEL4 платформа	(de Jong et al., 2010)
Открити начала на репликация на плазмиди	Rep2 на контиг 79	Софтуер PlasmidFinder	(Carattoli et al., 2014)

### 1.8. Характеризиране на *Enterococcus faecium* чрез целогеномно секвениране

Потенциалните изолати от род *Enterococcus* бяха подбрани чрез първоначална селекция на среда D-coccosel. От всеки един изолат бяха приготвени супернатанти. Третирането на супернатантата с протеиназа К доведе до загуба на инхибиторна активност срещу индикаторния микроорганизъм, което доказва, че инхибиторният(ите) агент(и) са вид бактериоцин(и) (фиг. 5). В резултат от подравняването с BLAST на техните 16S rRNA генни последователности установихме, че и двата изолата принадлежат към вид *Enterococcus faecium*. За да охарактеризираме двата изолата извършихме целогеномно секвениране. Допълнителни анализи на последователностите от целогеномното секвениране показаха, че изолатите са клонално идентични, следователно и двата принадлежат към един щам, който нарекохме *Enterococcus faecium* EFD. Поради този факт, продължихме своята работа само само с един от изолатите. С помощта на софтуерът QUAST направихме оценка на метриците на генерираните драфт асемблирани геноми, което доведе до следните резултати: обща дължина от 2 611 074 б.д., N50 от 98 462 б.д, GC съдържание 38,03% и 69 контига, по-големи от 1000 б.д. Тези стойности са в съгласие с тези на публично достъпните геноми на *Enterococcus faecium* на NCBI. Генерираните геномни данни ни позволиха едновременно извършване на различни видове анализи необходими ни, с цел, определяне дали този щам може да се счита за безопасен. Всички резултати са обобщени в (Таблица 5)



Фигура № 5 – Демонстрирана инхибиторна активност на супернатанта от *Enterococcus faecium* EFD срещу *Paenibacillus larvae* чрез агар-ячков метод. В горната част е представено инхибиране на *Paenibacillus larvae*



от необработена супернатанта при която се наблюдава ореол от 3 мм. представляващ зона на инхибиране без растеж на колонии от *Paenibacillus larvae*. В долната част, супернатантата е третирана с протеиназа К и се наблюдава растеж на колонии *Paenibacillus larvae* до самият ръб на агара. Панел А – цялата петриева паничка; Панел В – Увеличение на зоната с агаровите ямки. Ореолът с липса на растеж може да се наблюдава в горната част.

**Таблица № 5** – Генетична характеристика на *Enterococcus faecium* EFD на база на получените резултати от новогенерационното секвениране

Ген данни	Контиг	Продукт/функция	Референция към база
<b>Бактериоцини и антимикробни компоненти</b>			
<i>bac32</i>	contig00038	Bacteriocin	NCBI: WP_074398906.1
<i>entA</i>	contig00001	Bacteriocin EntA	GenBank: AAD29132.1
<i>entP</i>	contig00043	Enterocin P	UniProtKB: A0A3F3G1D8
<i>entSE-K4</i>	contig00048	Enterocin SE-K4	UniProtKB: Q8GR39
<i>entlA</i>	contig00022	Enterolysin A	NCBI: WP_002331349.1
<b>Фактори за вирулентност</b>			
<i>acm*</i>	contig00001	Collagen adhesin	GenBank: CP003351.1
<i>efaA*</i>	contig00025	Endocarditis-specific antigen A (adhesin)	GenBank: AF042288.1
<b>Антибиотична резистентност</b>			
<i>aac(6)-Ii**</i>	contig00001	Aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase family	NCBI: WP_063978482.1
<i>msr(C)***</i>	contig00004	ABC-F subfamily protein (MsrC efflux pump)	NCBI: WP_002314314.1
<b>Плазмидни начала за репликация</b>			
<i>repI</i>	contig00027	repE(pIP816)	GenBank: AM932524.1
<i>rep18a</i>	contig00038	repA(p200B)	GenBank: AB158402.1

\*Вероятно нефункционален поради многобройни замествания, индел-и и мутации при изместване на рамката на четене

\*\*Хромозомният AAC (6')-Ii е отговорен за загубата на синергизъм между аминогликозидите (с изключение на гентамицин, амикацин и стрептомицин) и пеницилини или гликопептиди (антимикробни агенти, които инхибират синтеза на клетъчната стена)

\*\*\*Вътрешна резистентност към макролиди и ниско ниво на резистентност (MIC 1–2 µg/ml) към съединения на стрептограмин В

В резултат на извършеният скрининг за наличие на генетични детерминанти на бактериоцини можем да кажем, че антибактериалната активност на *Enterococcus faecium* EFD може да бъде резултат от активността на един или повече от петте открити

бактериоцина: бактериоцин 32, ентероцин А, ентероцин Р, ентероцин SE-K4 и ентеролизин А.

## **2. Микробни изолати от хранителни продукти**

### **2.1. Изготвяне на колекция от изолати**

За да характеризираме микробиални изолати от хранителни продукти се спряхме на 31 бр. естествено ферментирали млечни продукти (кашкавал и домашни сирена произведени от краве, козе, биволско или овче мляко), месни продукти (луканка, суджук и сух салам), закваска за хляб, кисело зеле, маслини. С цел, обхващане на пълното многообразие и локалните вариации в състава, използваните при експериментите продукти бяха подбрани от различни региони на страната: гр. Русе, с. Мокреш, обл. Монтана, с. Искра, общ. Първомай, с. Козарско, общ. Брацигово, гр. София, с. Черни вит, както и от Гърция и Италия.

Щамовете бяха изолирани от различните видове хранителни продукти като беше изготвена колекция от 303 бр. щама. Изолатите от всеки един хранителен продукт бяха култивирани в петриеви панички, като използваните среди за култивиране на събраната колекция от изолати бяха следните: Brain Heart Infusion (BHI) бульон и агар (*Merck*), De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) бульон и агар (*Merck, Scharlau Chemie*), M17 бульон и агар (*Merck, Scharlau Chemie*), Luria Broth (LB) бульон и агар (*Scharlau Chemie*), Elliker бульон и агар (*Scharlau Chemie*). Селективната среда използвана при култивирането на бактериите, с цел, изучаване на техните морфологични и физиологични особености е D-Coccosel агар (*bioMerieux, Marcy l'Etoile, France*). Общият брой на колонии варираха между 14 и 42 на петри. Изолирането на единични колонии от петритата със селективна среда D-Coccosel беше извършено на база наличие на черен ореол около бактериалната колония. На случаен принцип бяха подбрани по три колонии с ясно изразен такъв ореол от всяка една петриева паничка. На тези изолати бяха присвоени уникални номера, кодиращи следната фактология: буквен символ в началото кореспондиращ с хранителният продукт от който произхожда изолата и четири цифрен символ обозначаващ следното: първата цифра представлява вида хранителна среда, втората вида продукт и последните две кореспондират с поредния номер на съответния изолат.

## 2.2. Начално характеризиране на щамове

В процеса на начално охарактеризиране, на всички изследвани изолати (включително на тези изолирани от пчелни продукти) бяха извършени тестове за наличие на бактериоцинова и/или протеолитична активност (фиг. 6), както и антибиограми, отчетени спрямо EUCAST критериите, представени в табл. 2. На всички щамове бяха извършени и тестове за фенотипно изявена антибиотична резистентност. Резултатите показаха, че изследваните от нас изолати са податливи на всички тествани антибиотици и няма наличие на устойчиви щамове спрямо използваните количествени критерии.

От общият брой анализирани щамове (348 бр.), изолатите проявяващи бактериоцинова активност бяха 97 бр., тези с протеолитична активност бяха 23 бр., а едновременно и двата типа активности бяха отчетени при 9 бр. Останалите 219 щамове не демонстрираха активност (фиг. 6).



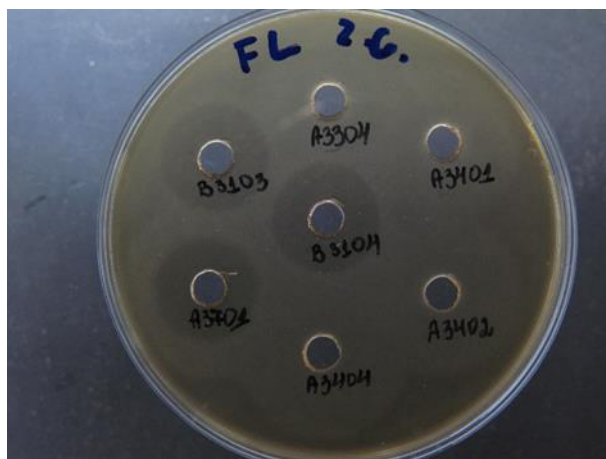
Фигура № 6 – Щамове проявяващи бактериоцинова и/или протеолитична активност

За да установим пълният антипатогенен спектър на действие, изолатите с изявена бактериоцинова активност бяха тествани срещу панел от 9 щамове. Те включваха представители на различни таксономични групи с потенциални патогени в тях. За целта беше приложен агар-ямковия метод. Щамове от използвания панел, заедно с температурите и средите на култивиране са описани в таблица № 6.

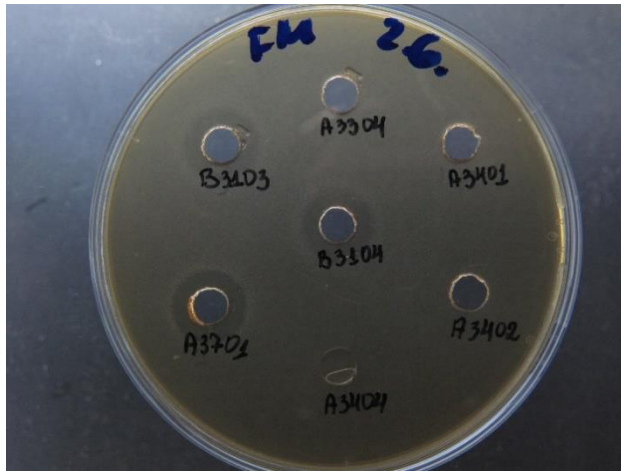
Таблица № 6

№	Щам	Среда на култивиране	Температура на култивиране
1	<i>Enterobacter aerogenes</i> EA	BHI	30°C
2	<i>Enterococcus durans</i>	BHI	30°C
3	<i>Enterococcus faecalis</i> FL 3915	BHI	30°C
4	<i>Enterococcus faecium</i> FM 3587	BHI	30°C
5	<i>Lactococcus gariveae</i> LG	BHI	30°C
6	<i>Listeria monocitogenes</i> LM	BHI	30°C
7	<i>Staphylococcus aureus</i> SA	BHI	30°C
8	<i>Yersinia ruckeri</i> YR	BHI	30°C
9	<i>Paenibacillus larvae</i>	MPA	30°C

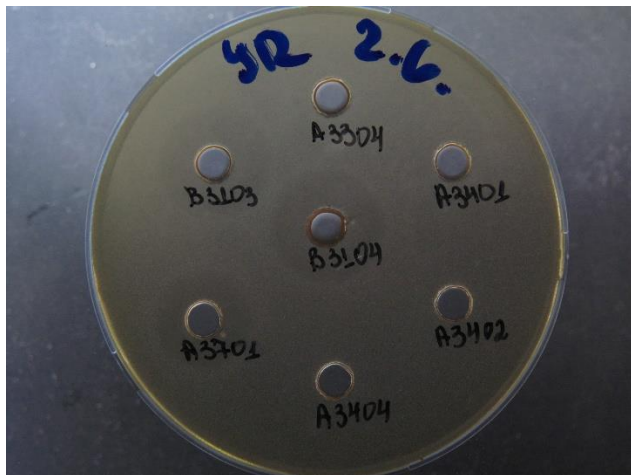
На фигури № 7 - 12 са представени примерни резултати от проведените изследвания по агар-ямков метод за наличие на активност срещу следните щамове: *Enterococcus faecalis* (фиг. 7), *Enterococcus faecium* (фиг. 8), *Yersinia ruckeri* (фиг. 9), *Lactococcus gariveae* (фиг. 10), *Listeria monocytogenes* (фиг. 11), *Paenibacillus larvae* (фиг. 12). Зоните на инхибиране могат да бъдат наблюдавани като ореоли около ямките.



Фигура № 7 - Тестване на щамове по агар-ямков метод срещу *Enterococcus faecalis*



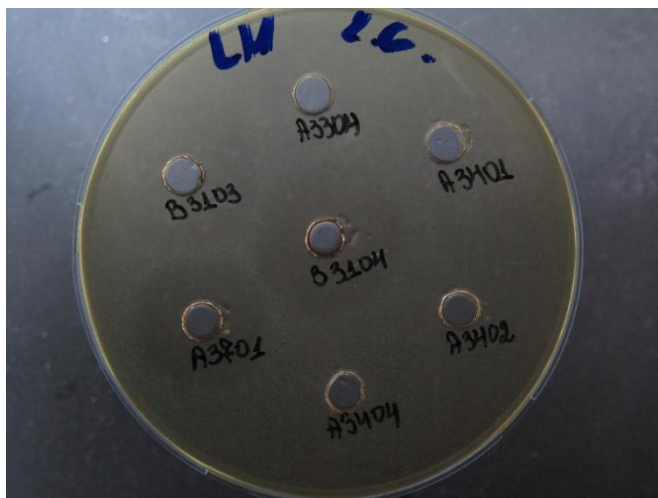
Фигура № 8 - Тестване на щамове по агар-ямков метод срещу *Enterococcus faecium*



Фигура № 9 - Тестване на щамове по агар-ямков метод срещу *Yersinia ruckeri*



Фигура № 10 - Тестване на щамове по агар-ямков метод срещу *Lactococcus gariveae*



Фигура № 11 - Тестване на щамове по агар-ямков метод срещу *Listeria monocytogenes*



Фигура № 12 - Тестване на щамове по агар-ямков метод срещу *Paenibacillus larvae*

В резултат на извършените изследвания, беше установено следното: щамове проявяващи бактериоцинова активност срещу един щам бяха 41 бр., щамове проявяващи бактериоцинова активност срещу два щам бяха 26 бр., щамове проявяващи бактериоцинова активност срещу три щам бяха 7 бр., щамове проявяващи бактериоцинова активност срещу четири щам бяха 8 бр., щамове проявяващи бактериоцинова активност срещу пет щам бяха 7 бр., щамове проявяващи бактериоцинова активност срещу шест щам бяха 4 бр. и щамове проявяващи бактериоцинова активност срещу седем щам бяха 0 бр., щамове проявяващи

бактериоцинова активност срещу осем щама бяха 3 бр. и един шам проявяващ бактериоцинова активност срещу девет щама (фиг. 13).



Фигура № 13 – Щамове проявяващи бактериоцинова активност срещу различен брой щамове

Инхибиране на развитието на патогенни микроорганизми беше наблюдавано предимно при изолати от следните групи продукти (табл. 7):

Таблица № 7 – Продукти от които са и золирани щамовете и техните активности

Активности	Продукти от които са изолирани щамовете
<b>Срещу 1-2 щама</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Пчелни кошери (гр. Видин, гр. София, С. Душанци и с. Момчиловци);</li> <li>• Италиански сух салам;</li> <li>• Зелено сирене (с. Черни вит);</li> <li>• Козя суроватка, меко козе сирене и овче кисело мляко от Производител № 1 (с. Искра, общ. Първомай).</li> </ul>
<b>Срещу 3-5 щама</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Пчелни кошери (гр. Видин, гр. София и с. Душанци);</li> <li>• Овче кисело мляко от Производител № 1;</li> <li>• Суджук от Производител № 2 (с. Козарско, общ. Брацигово);</li> <li>• Кисело зеле;</li> <li>• Овче сирене и овче кисело мляко от Производител № 3 (с. Мокреш, обл. Монтана).</li> </ul>

Срещу 6-9 щама	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Закваска за хляб;</li> <li>• Суджук от Производител № 2.</li> </ul>
----------------	--

### 2.3. Извършване на видово определяне на избрани изолати с помощта на 16S секвениране

Селектирахме група от най-интересните щамове въз основа на спектър и сила на установена антимикробна активност, както и на продукцията на протеази. От всички изолати в групата изолирахме тотална ДНК и изпратихме аликвоти до MacroGen (macrogen.com) за определяне последователностите на 16S регионите чрез секвениране по Sanger. Получените резултати са описани в таблица № 8.

Таблица № 8 – Резултати от секвениране на 16S регионите на анализиранияте щамове

№	Щам	Продукт от който е изолиран щам	Резултати от 16S секвениране
1	A1401	Производител № 2 SRN Сирене "Резерв"	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
2	A1404	Производител № 2 SRN Сирене "Резерв"	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
3	A1604	Производител № 2 LN Луканка	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
4	A4102	Производител № 2 PMN Пробиотично мляко	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
5	B1103	Закваска	<i>Enterococcus faecium</i>
6	B1104	Закваска	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
7	B3102	Закваска	<i>Lactiplantibacillus brevis</i>
8	BH111201	пчелни щамове от: Обеля, черво, късна есен	<i>Enterococcus faecalis</i>
9	BH111203	пчелни щамове от: Обеля, черво, късна есен	<i>Enterococcus faecalis</i>
10	BH121206	пчелни щамове от: Обеля, прашец, късна есен	<i>Rosenbergia</i>
11	C2202	SYH - Овче кисело мляко от Производител № 1	<i>Enterococcus faecalis</i>
12	D1101	кисело зеле	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
13	D1102	кисело зеле	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
14	D4103	кисело зеле	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
15	F10504	GYCM75 - Кози кашкавал от Производител № 3	<i>Enterococcus faecalis</i>
16	F10804	GFCM75 - Меко козе сирене от Производител № 3	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
17	F10902	HMCM75 - Домашно сирене от Производител № 3	<i>Enterococcus faecalis</i>
18	H1041	зелено сирене от с. Черни вит - овче твърдо сирене на 8 месеца	<i>Enterococcus faecalis</i>

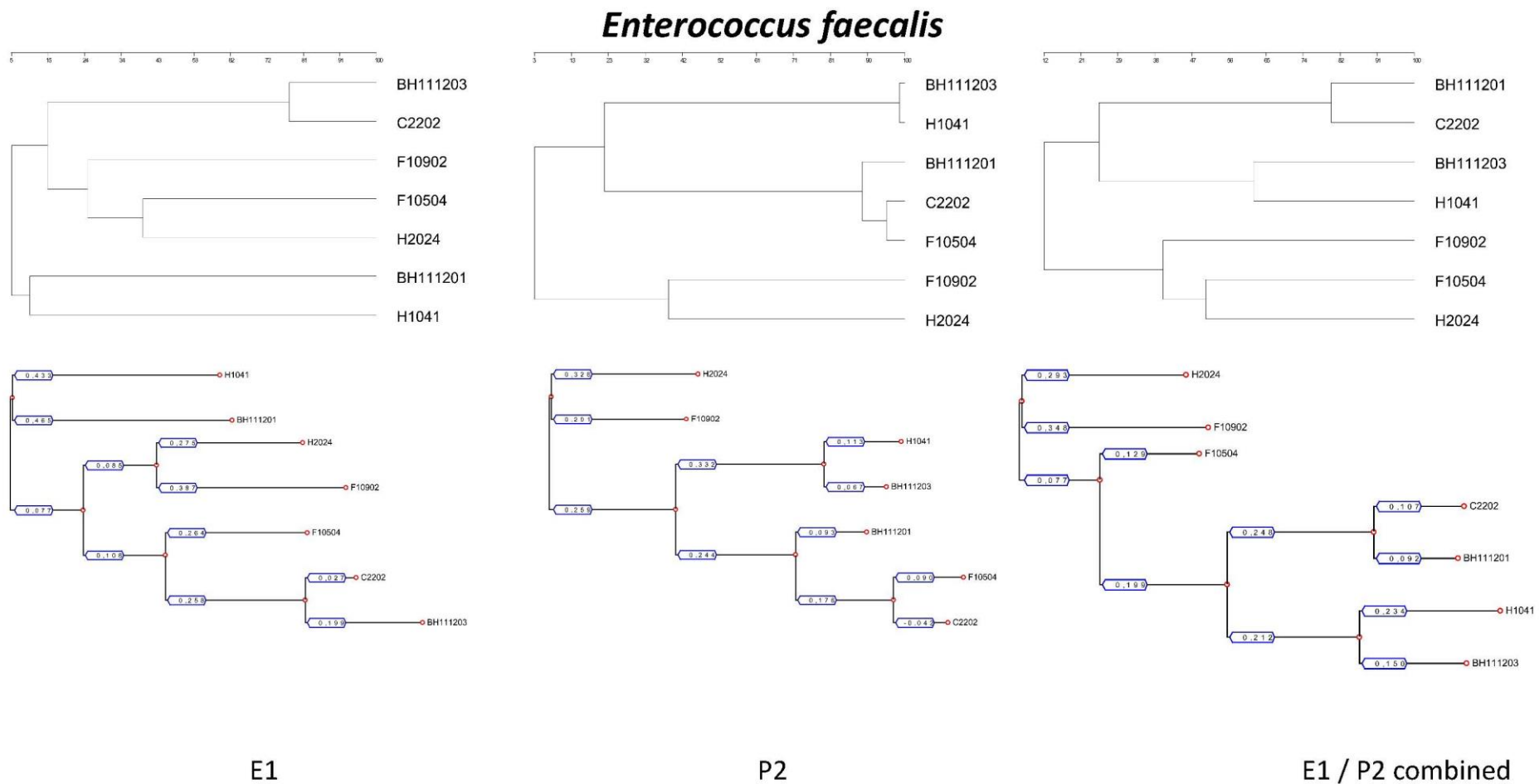


19	H2011	зелено сирене от с. Черни вит - козе сирене на 5 месеца	<i>Serratia sp.</i>
20	H2013	зелено сирене от с. Черни вит - козе сирене на 5 месеца	<i>Staphylococcus equorum</i>
21	H2022	зелено сирене от с. Черни вит - овче меко сирене на 8 месеца	<i>Staphylococcus equorum</i>
22	H2024	зелено сирене - овче меко сирене на 8 месеца	<i>Enterococcus faecalis</i>
23	H2031	зелено сирене от с. Черни вит - овче твърдо сирене на 7 месеца	<i>Staphylococcus gallinarum</i>
24	H2032	зелено сирене от с. Черни вит - овче твърдо сирене на 7 месеца	<i>Staphylococcus equorum</i>
25	H2041	зелено сирене от с. Черни вит - овче твърдо сирене на 8 месеца	<i>Staphylococcus equorum</i>
26	H4011	зелено сирене от с. Черни вит - козе сирене на 5 месеца	<i>Serratia species.</i>
27	H4021	зелено сирене от с. Черни вит - овче меко сирене на 8 месеца	<i>Proteus vulgaris</i>

#### 2.4. Филогенетични изследвания на избрани изолати чрез RAPD

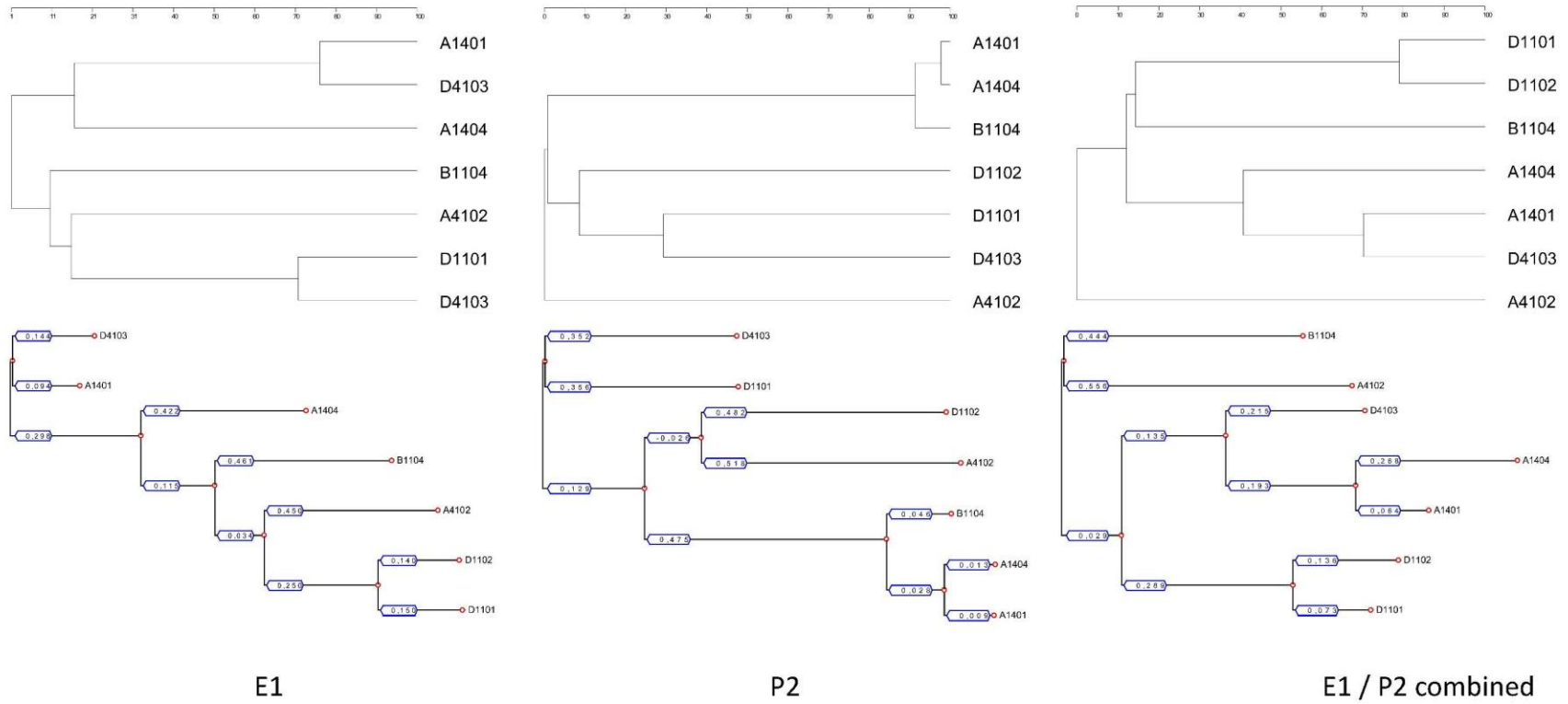
За изясняване на филогенетичните връзки и наличие на евентуална клонална свързаност, 21 бр. изолата принадлежащи към *Enterococcus faecalis* и 21 бр. изолата принадлежащи към *Lactiplantibacillus plantarum* с изявени протеолитична и/или бактериоцинова активност бяха подложени на RAPD анализ. За целите на въпросното изследване бяха използвани праймерите E1 и P2, както и E1/P2 в комбинация. За изчисляването на матриците на сходство на базата на картината от протеклата гел-електрофореза и конструирането на UPGMA дендрограмите беше извършено с помощта на софтуерът GeneTools (Syngene) чрез алгоритъма на Jaccard (1901).

Резултатите под формата на UPGMA дендрограми са показани на фиг. 14 и фиг. 15.



Фигура № 14 - UPGMA дендрограми на *Enterococcus faecalis* получени с праймери E1 и P2 след RAPD анализ.

## *Lactiplantibacillus plantarum*



Фигура № 15 - UPGMA дендрограми на *Lactiplantibacillus plantarum* получени с праймери E1 и P2 след RAPD анализ.

Преобладаващите прагове за групиране на клонално свързани бактериални щамове, описани в научните публикации, обикновено варират между 70% и 75% сходство (Grundmann et al., 1997; Webster et al., 1996). При тези общоприети критерии сформиранияте клъстери означават наличие на клонално сходство между анализиранияте щамове.

В свое проучване за праговете на клъстериране при изследване на филогенетична свързаност на потенциално бактериоциногенни представители на *Enterococcus*, Димов и съавтори демонстрират, че този праг води до неубедителни резултати (S. Dimov, Strateva, Petkova, Dimitrova, & Atanasova, 2015), като според авторският колектив прагът от 70% до 75% наистина трябва да се разглежда като индикация за известно клонално родство, но в ограничена степен. Получените от нас резултати са в съгласие с това проучване по следните причини: при 70% сходство, сформиранияте клъстери при *Enterococcus faecalis* с праймер P2 са два – единият сформиран от изолат от пчелен кошер (ВН111203) и от изолат от зелено сирене (Н1041). С праймери E1/P2 в комбинация отново се наблюдава клъстериране на изолат от пчелен кошер (ВН111201) и изолат от млечен продукт (С2202 – овче кисело мляко). Изолатите са както от различни източници, така и от различни географски региони на страната. С повишаване на прага на сходство до 95% се наблюдава увеличаване на негрупираните щамове.

По подобен начин се наблюдава сформиранията на клъстери при *Lactiplantibacillus plantarum* с използване отново на праймери E1, P2 и E1/P2 в комбинация. При разглеждане на клонално сходство с праг 70% се сформират три хомогенни и един хетерогенен клъстер сформиран от щамове D4103 и A1401 изолирани съответно от кисело зеле и краве сирене.

Наблюдаваната хетерогенност в сформиранияте клъстери не предполага сегрегация на щамове въз основа на тяхната природа или географски произход. Следователно, в съгласие резултатите получени от Димов и съавтори, можем да заключим, че използването на 70% праг на сходство е неподходящо, когато се изследват щамове за клонова родственоост от различни типове и произхождащи от различни места. По-високият праг от 95%, необходим за групиране на изолатите, вероятно би могъл да индикира отделните еволюционни линии на изследваните от нас щамове, показваща по-голяма родственоост между тях.

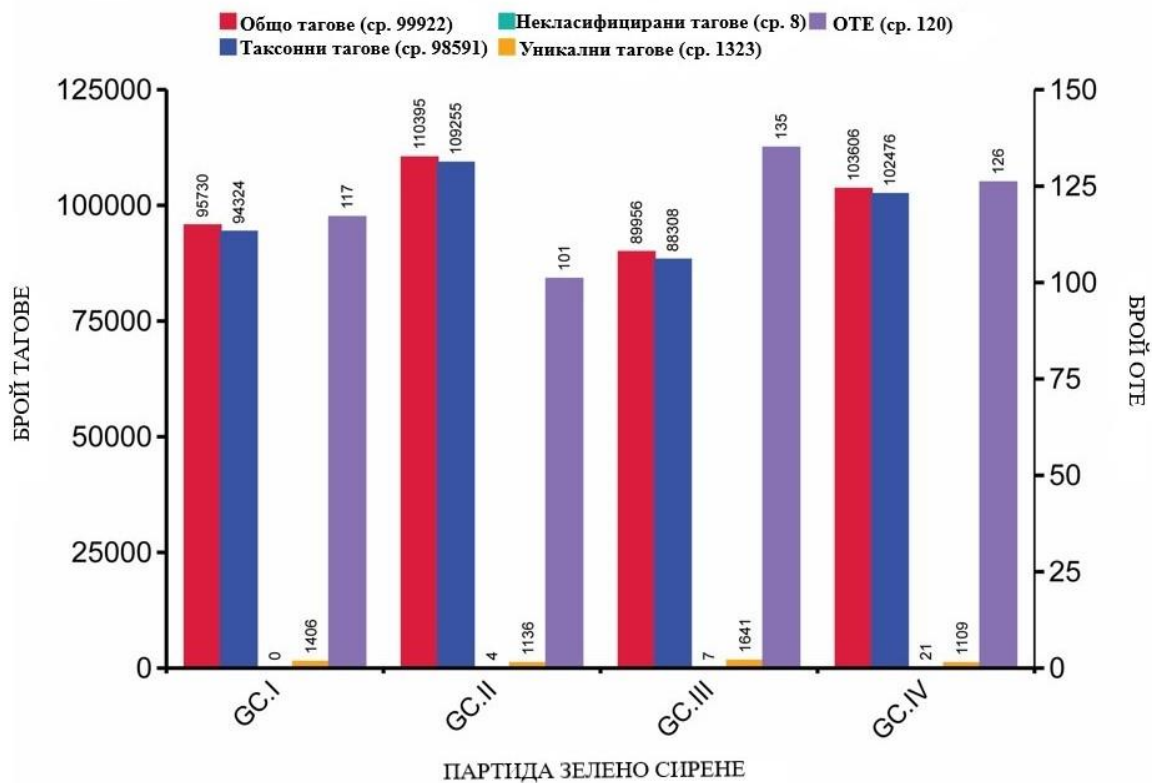
### 3. Допълнителен анализ на микробните изолати от зелено сирене

#### 3.1. Резултати от проведено ампликонно метагеномно секвениране от следващо поколение

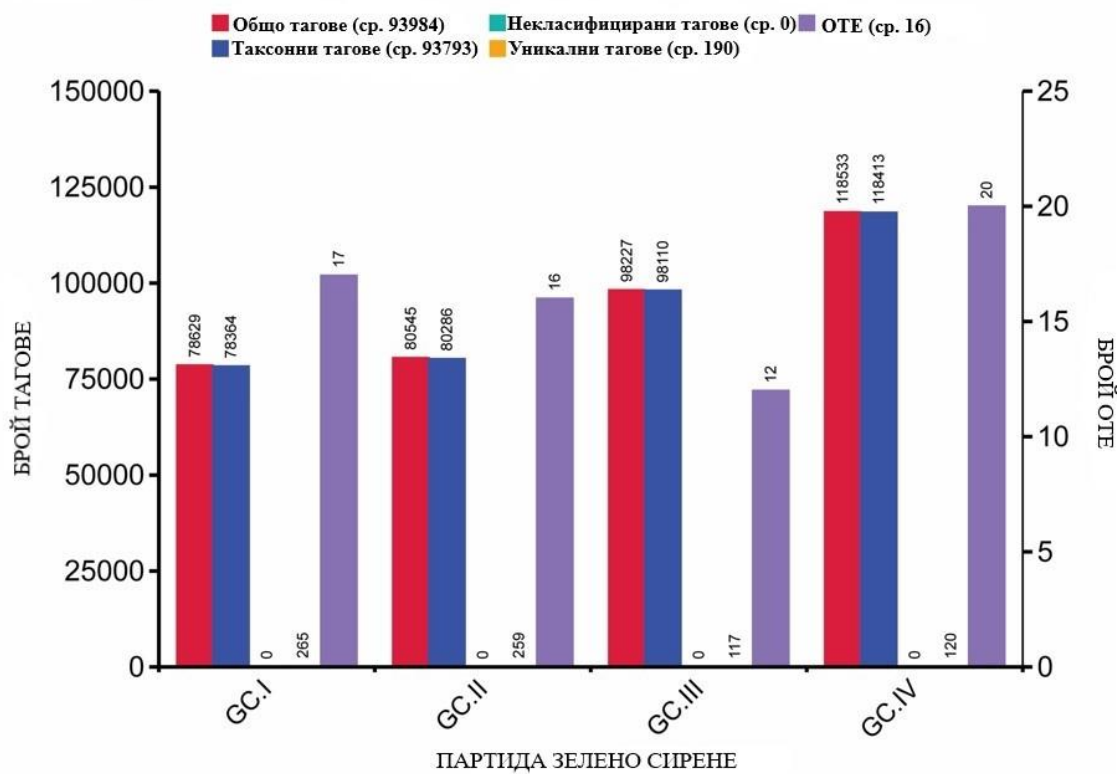
За да определим видовото разнообразие на микроорганизмите в традиционното българско зелено сирене от региона на Тетевен приложихме метода на ампликонно метагеномно секвениране от следващо поколение. Таргетираните за размножаване и секвениране региони бяха V3-V4 участъка от 16S локуса при бактерии, както и ITS2 региона при гъби. Определените секвенционни прочити, генерирани с помощта на платформата Illumina HiSeq), бяха с достатъчно добро качество за по-нататъшни анализи. Процентът на получените ефективни етикети варираше между 66,20% и 78,98% за последователностите на V3-V4 региона и между 88,32% и 95,75% за региона ITS2. Повисоките проценти за ITS2 се обясняват частично с по-късата му дължина (386 бд) в сравнение с 16S целевата област (466 бд), независимо от близките стойности на Q20 и Q30 параметрите, индикиращи качеството на секвенирането (около 98% и съответно 94%). Получените средни дължини на двата типа последователности са близки до очакваните.

#### 3.2. Определяне на броя на оперативните таксономични единици (ОТЕ)

Определихме броят на оперативните таксономични единици, като резултатите са показани на фиг. 16 и обобщени в табл. 9. Средните стойности на различните показатели за бактериалните 16S последователности на четирите партии зелено сирене бяха: ефективни етикети - 99922, анотирани етикети - 98591, неклассифицирани етикети - 8 и уникални етикети - 1323. За видовете гъби, при анализите на ITS2 регионите съответните стойности бяха: ефективни етикети - 93984, анотирани етикети - 93793, неклассифицирани етикети - 0 и уникални етикети - 190. Те бяха обединени в ОТЕ, като общият им брой е 179 за бактериалните видове и 23 при видовете гъби. Средният брой на ОТЕ е съответно 120 за бактериални и 16 за видовете гъби. От бактериалните видове, 47 броя ОТЕ се състоят от над 100 секвенции (приблизително повече от 0,1% от общия брой), докато броят на аналогично композираните ОТЕ от видовете гъби е 11. В резултат от сравнението на ОТЕ, получени въз основа на ефективните тагове с  $\geq 97\%$  сходство (табл. 9, фиг. 16), в пробите от изследваните четири партии зелено сирене, бяха идентифицирани от 117 до 135 (средно 120) бактериални вида и от 12 до 20 (средно 16) вида гъби.



Графика А: Еубактериални ОТЕ базирани на извършен 16S анализ



Графика Б – ОТЕ при видовете гъби базирани на извършен ITS2 анализ

Фигура № 16 - Обобщение на броя на етикетите (тагове) и броя на оперативните таксономични единици във всяка една проба.

При бактериалните видове (Графика А) и видовете гъби (Графика Б).

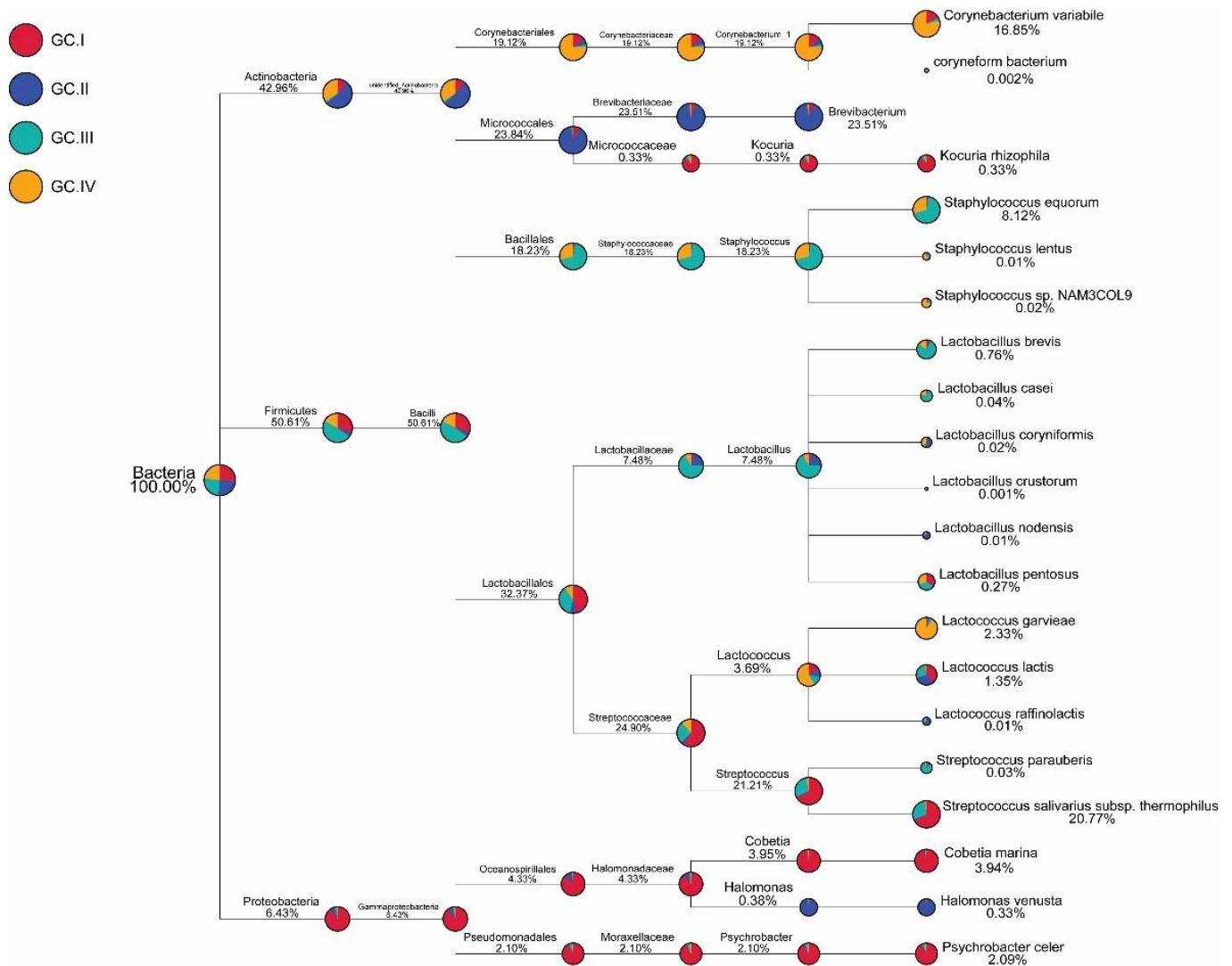
Таблица № 9 - ОТЕ анализ

Партида зелено сирене	Брой на ефективните етикети	Брой на аотираните етикети	Брой на неклассифицираните етикети	Брой на уникалните етикети	Брой на ОТЕ
<i>Секция А – бактериален 16S анализ</i>					
GC I	95730	94324	0	1406	117
GC II	110395	109255	4	1136	101
GC III	89956	88308	7	1641	135
GC IV	103606	102476	21	1109	126
<i>Средно</i>	<i>99922</i>	<i>98591</i>	<i>8</i>	<i>1323</i>	<i>120</i>
<i>Секция В – анализ на ITS2 региона при гъби</i>					
GC I	78629	78364	0	265	17
GC II	80545	80286	0	259	16
GC III	98227	98110	0	117	12
GC IV	118533	118413	0	120	20
<i>Средно</i>	<i>93984</i>	<i>93793</i>	<i>0</i>	<i>190</i>	<i>16</i>

### 3.3. Таксономична анотация на ОТЕ

С помощта на софтуерът Qiime v.1.7.0 беше получена информация за броя на оперативните таксономични единици във всяка проба. Въз основа на получените резултати построихме таксономични дървета на групи, съставени от първите десет рода при бактериалните (фиг. 17) и при видовете гъби (фиг. 18). Обозначени са двадесет бактериални вида и десет вида гъби. При бактериалните ОТЕ, най-преобладаващия тип е Firmicutes (50,61%), представен от родовете *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus* и *Lactococcus*, който е последван от Actinobacteria (42,96%), представен от родовете *Brevibacterium*, *Corynebacterium* и *Kocuria*, и накрая протеобактериите (6,43%) представени от родовете *Cobetia*, *Psychrobacter* и *Halomonas*. Най-голям процент (99,99%) от разглежданите видове гъби принадлежат на Ascomycota, представена от *Penicillium roqueforti*, *Scopulariopsis flava*, *Debaryomyces hansenii*, *Pichia membranifaciens*, *Candida zeylanoides*, *Kluyveromyces lactis*, *Torulasporea delbrueckii*, *Fusarium oxysporium* и *Trichothecium roseum*, докато Zygomycota (0,01%) е представена главно от *Circinella muscae*. Резултатите от относителното изобилие от таксонни типове са представени на фиг. 19, където три бактериални типа (Firmicutes, Actinobacteria и Proteobacteria) и два типа гъби (Ascomycota и Zygomycota) заедно сформират почти 100%. Съобразно информацията за видовото разнообразие, която получихме, съставихме таксономична клъстерна топлинна карта (heatmap). Тя е базирана на преобладаващите 35 рода от всички проби, а приликите и разликите между тях са

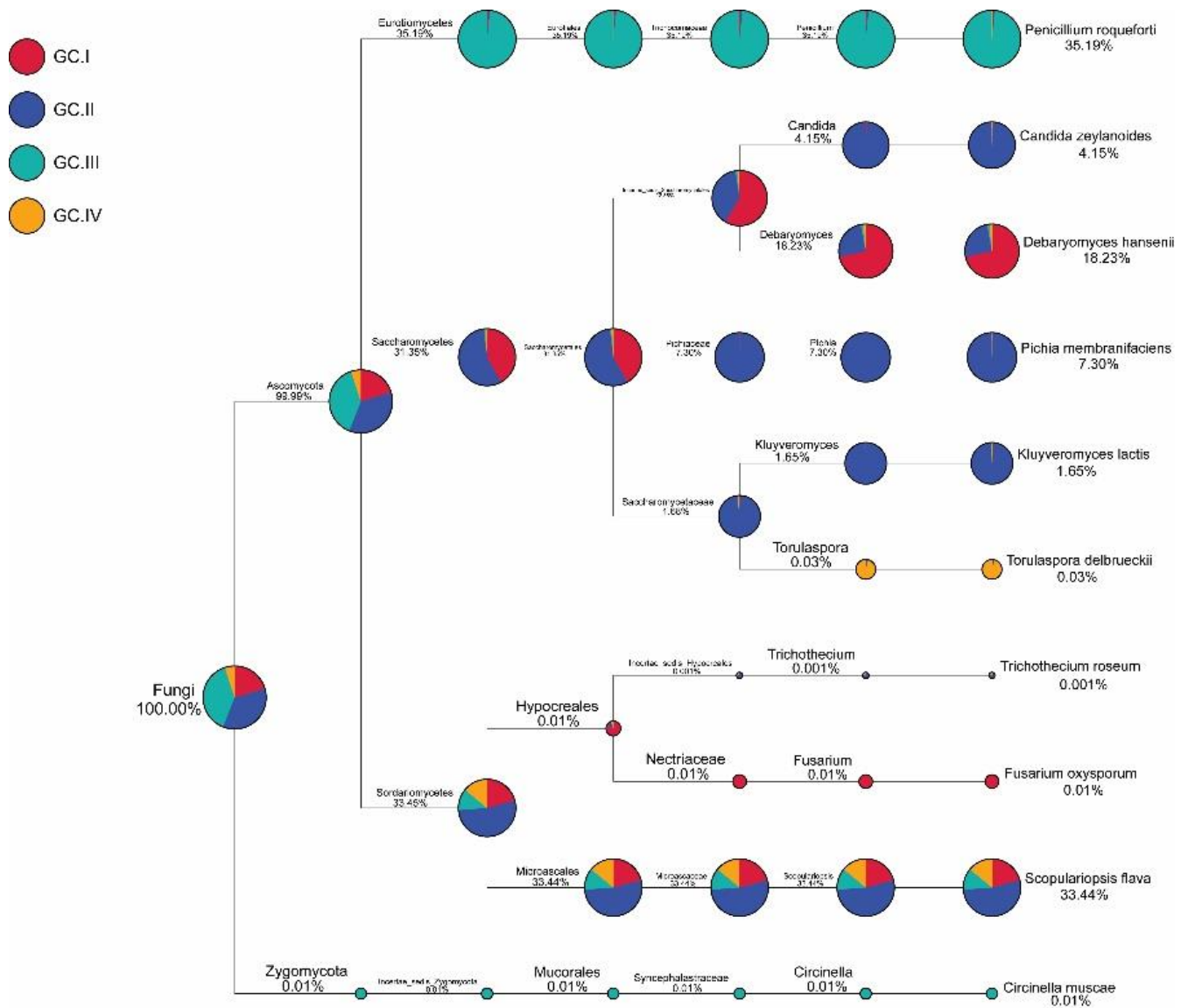
представени на фиг. 20 (топлинната карта при гъби включва само 11 рода, поради по-малкия брой наблюдавани родове).



Фигура № 17 - Таксономично дърво на бактериалната група.

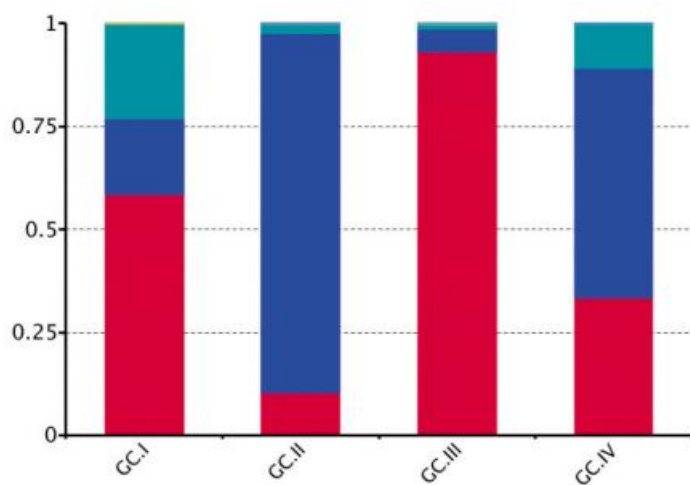
Размерът на кръговете представя сравнителното видово изобилие. Представени са процентите в таксоните.

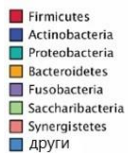




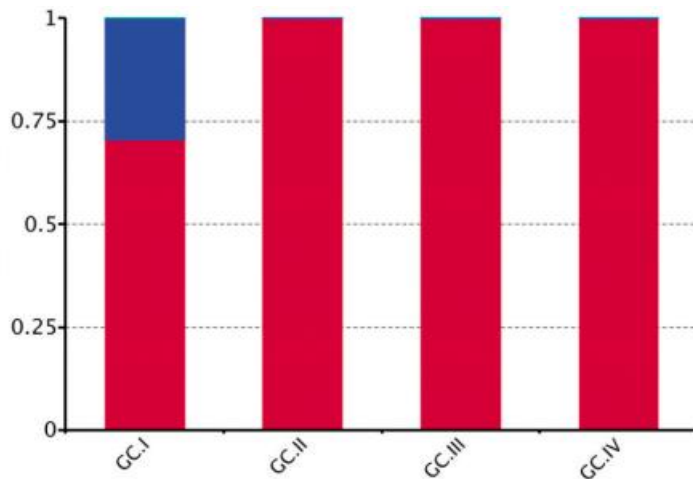
Фигура № 18 - Таксономично дърво на група гъби.

Размерът на кръговете представя сравнителното видово изобилие. Представени са процентите в таксоните.





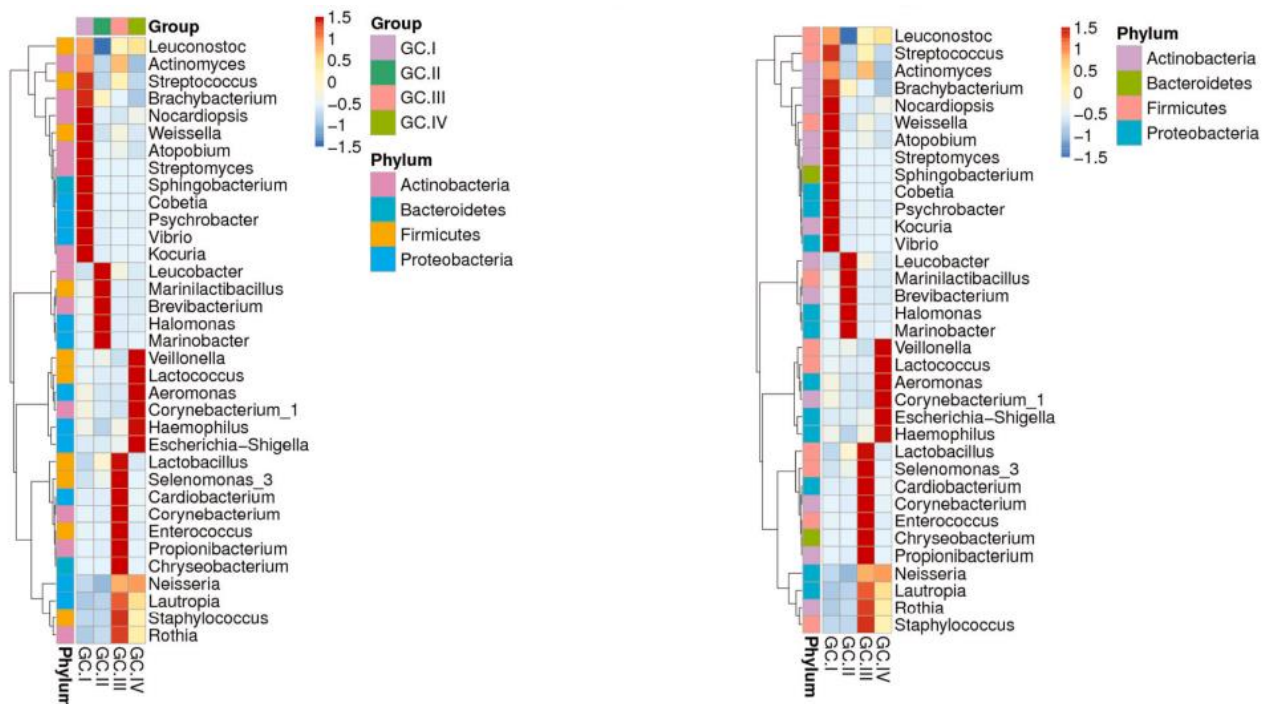
Графика А: Сравнително разнообразие на еубактериалните типове



Графика Б: Сравнително разнообразие на типовете гъби

Фигура № 19 - Сравнително изобилие на наблюдаваните типове.

Графика А – еубактериални типове; Графика Б – типове гъби.



Графика А: Топлинна карта отразяваща таксономичното изобилие на родовете при еубактерии



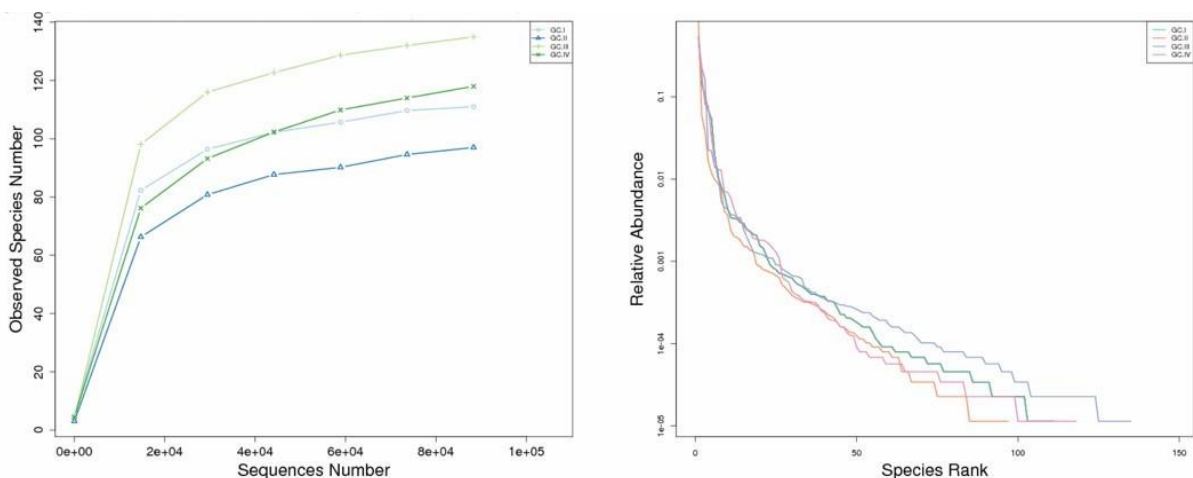
Графика Б: Топлинна карта отразяваща таксономичното изобилие на родовете при гъби

Фигура № 20 - Топлинна карта отразяваща таксономичното изобилие на родовете.

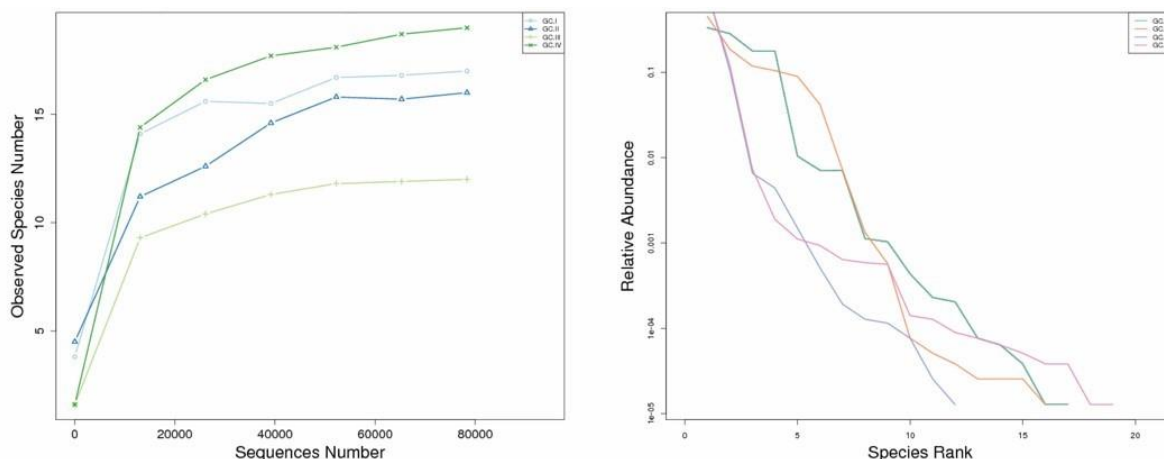
При бактерии (Графика А) и при гъби (Графика В). Наименованието на пробата е нанесено по оста X, докато оста Y отразява рода. Абсолютната стойност представлява разстоянието между необработения резултат и средната стойност на стандартното отклонение - тя е отрицателна, когато необработения резултат е под средната стойност и обратно.

### 3.4. Анализ на алфа разнообразието

Кривите на разреждане и видово разнообразие от бактериални и гъбични видове на партидите зелено сирене бяха изчислени въз основа на анализите на алфа разнообразието. Те са показани на фиг. 21 панел А и съдържащата се в тях информация позволява изготвяне на първична оценка на микробиома. В това проучване, всички партии показват доста сходни криви за видовете бактерии и гъби. Кривите характеризиращи биоразнообразието при бактерии и гъби в партидите зелено сирене, са показани на фиг. 21 панел Б.



Панел А: Криви характеризиращи биоразнообразието при бактериалните видове



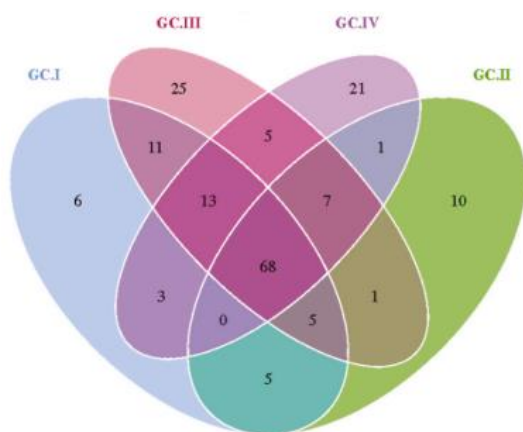
Панел Б: Криви характеризиращи биоразнообразието при видовете гъби

Фигура № 21 - Криви характеризиращи биоразнообразието.

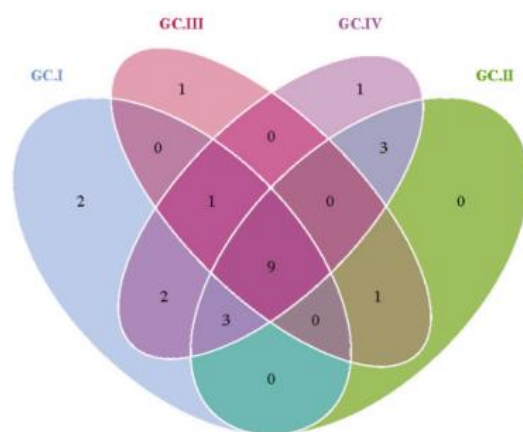
При бактериалните видове (Панел А) и видовете гъби (Панел Б), изчислени въз основа на анализите на алфа разнообразието на пробите от зелено сирене.

Бяха използвани индексите на алфа разнообразието Chao1 и ACE, позволяващи оценка на очакваното видово богатство в рамките на четирите партии сирене (Kim et al., 2017). Най-ниските стойности при бактериалните видове и за двата индекса се наблюдават при GC II, но те са много по-близки до стойностите на останалите три партии. Подобна картина се наблюдава и при анализите на разнообразието при видовете гъби. Изчислените стойности на индексите Chao1 и ACE са много близки до наблюдавания брой бактериални и гъбични видове, което не е изненада, тъй като изчисленият индекс на покритие на Good във всички проби беше 1.000, което означава, че всички проби бяха представителни за всички присъстващи видове в пробите (Chao, Lee, & Chen, 1988; Zhang et al., 2018). Като последна стъпка, изчислихме индексите на цялото филогенетично разнообразие, което предоставя информация за филогенетичната реализация на видовото богатство, но не отчита изобилието на видовете (Faith, 1992). За анализите при видовете гъби, стойностите на индекса показват същата тенденция като индексите Chao1 и ACE, но такава взаимна зависимост не се наблюдава при бактериалните анализи, вероятно поради много по-големия брой видове в сравнение с гъбите.

На фиг. 22 са представени цветови диаграми на Вен, съставени въз основа на анализа за съдържащите се общи и уникални за различните партии зелено сирене ОТЕ. На фигурата са означени и бройките на съответните типове ОТЕ, намерени в различните партии.



Графика А: Еубактериални видове



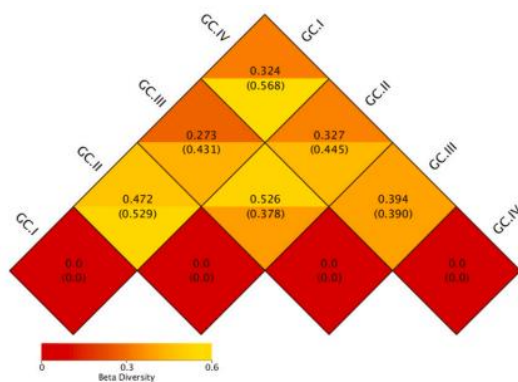
Графика Б: Видове гъби

Фигура № 22 - Цветни диаграми за бактерии и гъби

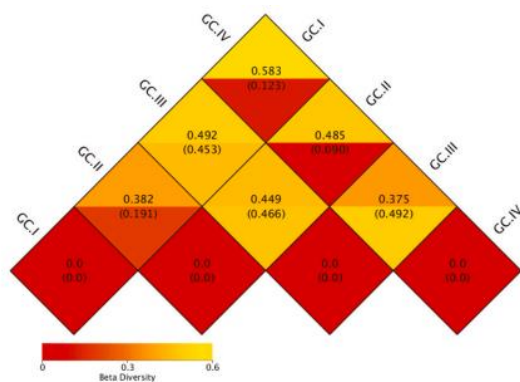
За бактерии (Графика А) и гъби (Графика Б), базирани на анализ на общата и уникална информация за ОТЕ в различните партии зелено сирене. Всяка елипса представлява една партидна проба. Стойностите в припокриващите се части представляват често срещани ОТЕ. Останалите са специфични ОТЕ във всяка проба.

### 3.5. Анализ на бета разнообразието.

Топлинните карти, базирани както на претеглените (количествени) и непретеглените (качествени) показатели за разстояние, използвани при извършване на сравнение на биологични общности (Unifrac), са показани на фиг. 23.



Панел А: Топлинна карта на бета разнообразието при еубактериални съобщества

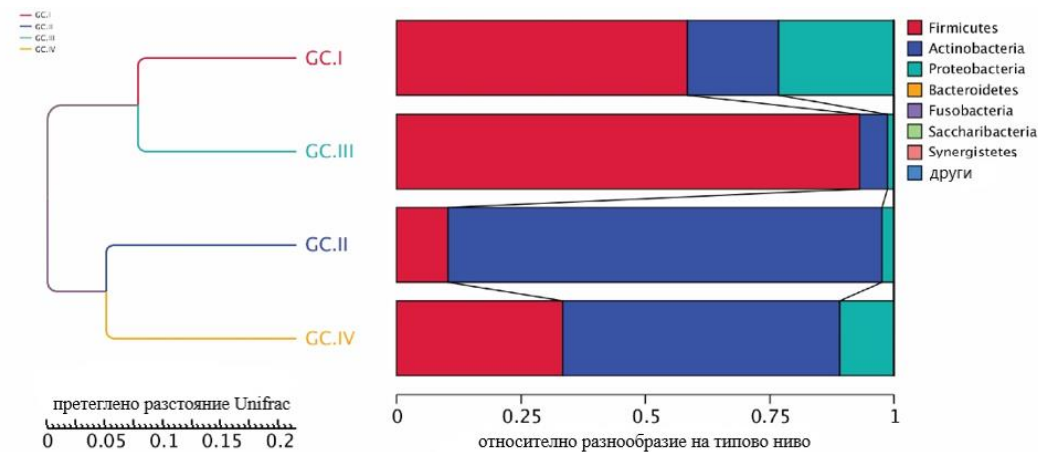


Панел Б: Топлинна карта на бета разнообразието при гъбни съобщества

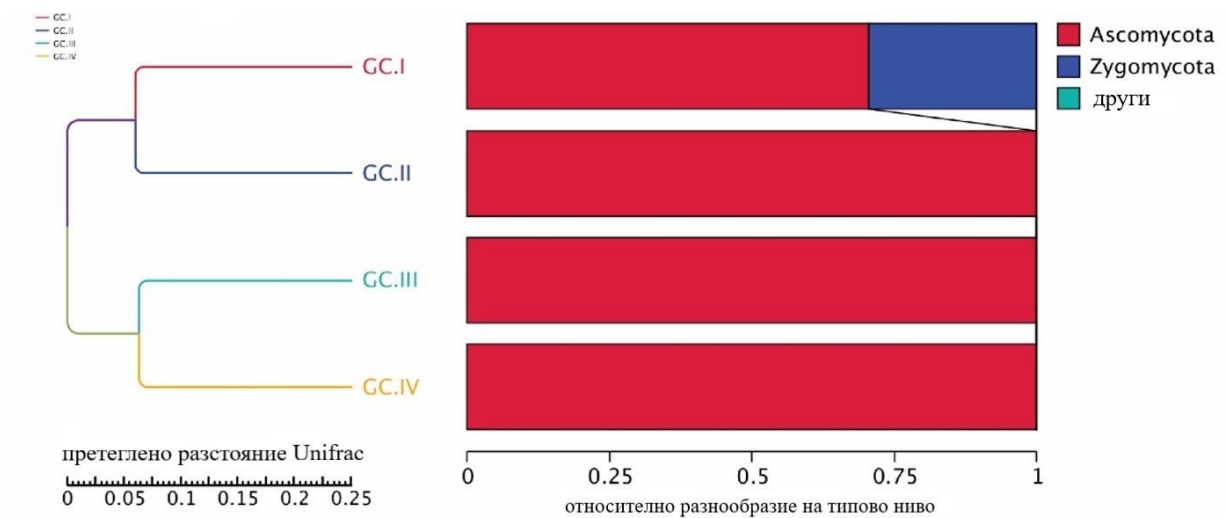
Фигура № 23 - Топлинна карта на бета разнообразието

Топлинната карта е изготвена въз основа на претеглените разстояния Unifrac и непретеглените Unifrac на микробните съобщества при бактерии (панел А) и гъби (панел В). Всяка решетка представлява коефициент на различие по двойки между двоедни проби, в който претегленото разстояние Unifrac е показано по-горе, а непретегленото разстояние Unifrac долу.

Клъстерните дървета, изчислени чрез метода на непретеглената двойка с аритметични средни (UPGMA) и изградени въз основа на изчислените матрици на разстоянието, са показани на фиг. 24 за претеглените разстояния Unifrac и на фиг. 25 за непретеглените разстояния Unifrac.



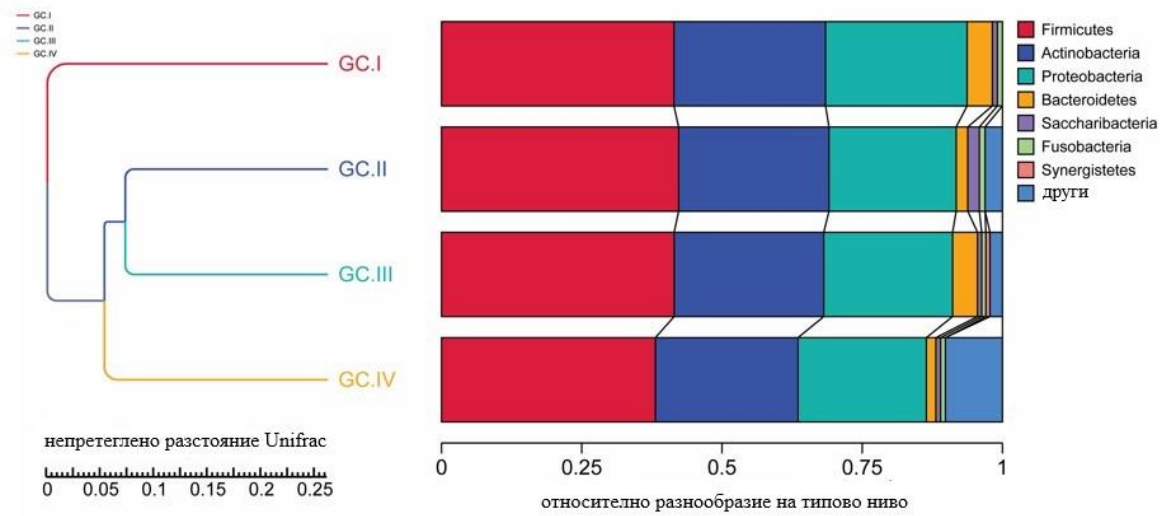
Графика А: Клъстерно дърво UPGMA изготвено на базата на претеглено разстояние Unifrac при бактерии



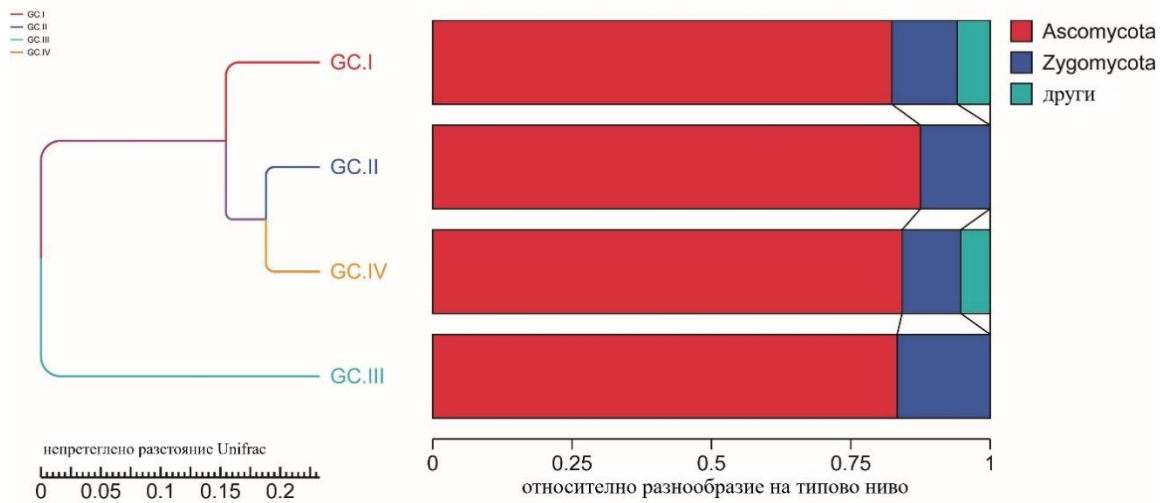
Графика Б: Клъстерно дърво UPGMA изготвено на базата на претеглено разстояние Unifrac при гъби

Фигура № 24 – Клъстерно дърво UPGMA изготвено на базата на претеглено разстояние Unifrac

При бактерии (Графика А) и гъби (Графика Б)



Графика А – Клъстерно дърво UPGMA при еубактерии



Графика Б - Клъстерно дърво UPGMA при гъби

Фигура 25 - Клъстерно дърво UPGMA, базирано на непретеглено разстояние Unifrac

При бактерии (Графика А) и гъби (Графика Б).

## ОБСЪЖДАНЕ

При нашето проучване събрахме и изследвахме колекция от 348 изолата, изолирани от различни хранителни продукти, както и от пчели и пчелни продукти, за наличие на антиминокробна активност. Фокусът на нашето изследване беше идентифицирането на бактериоцино-продуциращи ентерококови щамове, притежаващи потенциал да инхибират растежа на причинителя на заболяването американски гнилец, както и щамове притежаващи пробиотичен потенциал.

Проведените от нас експерименти с пчелните продукти бяха част от по-голям проект имащ за цел характеризирание на пчелния и кошерен микробиом в различни области в страната. След установен контакт с местен пчелар бяха взети проби от всички негови кошери. Според информацията, получена от производителя на пчелни продукти, кошерите му не са били засегнати от заболяването американски гнилец. Тази информация беше от голям интерес за нас, тъй като неговите съседи съобщиха, че пчелни кошери от ферма в съседство неколкократно са били жертва на заразяване с *Paenibacillus larvae* в следствие на което е било необходимо изгаряне на засегнатия инвентар. Пчелният производител, също така, беше извършил категоризация на кошерите си по отношение на тяхната производителност и общо благосъстояние.

МКБ при пчелите обикновено се намират в пчелният чревен тракт и е известно, че защитават своите гостоприемници чрез антиминокробни метаболити като органични киселини, водороден пероксид и антиминокробни пептиди, както и чрез модулиране на имунния отговор на гостоприемника. Много от тези полезни бактерии са изолирани от възрастни и ларви на медоносни пчели и пчелни продукти като мед и прашец (Alonso-Salces et al., 2017; Jaouani et al., 2014).

Проучванията на потенциала на пчелния млечнокисел микробиом по отношение на неговите ползи за доброто физическо състояние и повишаване на здравния статус датират от повече от десетилетие. Olofsson и Vasquez (Olofsson & Vasquez, 2008) демонстрират, че пчелите и пчелния микробиом еволюират взаимно свързано. Audisio и съавтори (Audisio & Benitez-Ahrendts, 2011) са сред пионерите, успели да докажат как присъствието на пробиотичен млечнокисел щам, изолиран от чревния тракт на медоносна пчела, дава отражение върху продуктивността на целия кошер. Детайлното изследване на колектива конкретизира продуцентът на млечна киселина *Lactobacillus johnsonii* CRL1647, като отговорен за наблюдавания ефект. През последните години бяха



акумулирани редица доказателства във връзка с пробиотичния потенциал на изолирани МКБ от пчели и пчелни продукти. Проведените проучвания са фокусирани предимно върху продуцирането на бактериоцини, инхибиращи патогенни микроорганизми и основно *Paenibacillus larvae*. Голяма част от тези щамове принадлежат на родовете *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Bifidus* и *Brevibacillus* (Bartel, Abrahamovich, Mori, López, & Alippi, 2018; Minnaard & Alippi, 2016). В тази връзка, в литературата наскоро бяха анонсирани и щамове *Fructobacillus fructosis*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter kobei* и *Morganella morganii* с подобна активност (Al-Ghamdi et al., 2020). Въпреки това, данните относно изолирани от пчели и пчелни продукти представители на род *Enterococcus* са доста оскъдни, независимо от широкото разпространение на този род в различни екологични ниши. Липсата на научни данни може частично да бъде обяснена с амбивалентната роля на ентерококите. Те обединяват от устойчиви патогени до задължителни участници в различни стартерни култури при ферментацията на различни хранителни продукти като сирене, сурово месо и др., включително обясняват и тяхното пробиотично действие (Ben Braiek & Smaoui, 2019; Graham, Stack, & Rea, 2020).

На събраната колекция от изолати първоначално извършихме родова идентификация, като целта ни беше да идентифицираме и анализираме представители на род *Enterococcus*. С помощта на агар-дифузионният метод извършихме изследване за наличие на протеолитична и бактериоцинова активност, в резултат на който 90 бр. от изолатите показаха бактериоцинова активност и 21 бр. протеолитична активност срещу 9 бр. индикаторни микроорганизми (*Paenibacillus larvae*, *Lactococcus garvieae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes*, *Yersinia ruckeri*, *Enterococcus faecium*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus durans*). Девет щамове показаха едновременно и протеолитична и бактериоцинова активност - тези щамове бяха изолирани от пчелни кошери (3 бр.), зелено сирене (3 бр.), овче кисело мляко (1 бр.) и закваска за хляб (2 бр.). Полученият от нас резултат е подобен на други проучвания, изучаващи бактериоциногенни ентерококи от различни източници (Birri, Brede, Tessema, & Nes, 2013; S. G. Dimov, 2007; S. G. Dimov et al., 2010; Klibi et al., 2012; Ozdemir, Oryaşın, Bıyık, Ozteber, & Vozdoğan, 2011), като е подчертана възможността тези активности да имат отношение към повишаване конкурентоспособността на някои изолати от род *Enterococcus* в специфични екологични ниши.

С известна изненада установихме, че изолатите от шест кошера притежават инхибиторна активност срещу *Paenibacillus larvae* (Табл. 1). С други думи, може да се

каже, че в известна степен 40% от колонииите притежават един вид „защита“ срещу заболяването Американски гнилец. За установяване на антимикробна активност използвахме агар-дифузионен метод. С помощта на същият метод Yoshiyama и колектив установяват, че бактериални изолати (сред които *Enterococcus*, *Lactobacillus* и *Weissella*), изолирани от средното черво на *Apis cerana japonica* също проявява инхибиторен ефект върху *Paenibacillus larvae* (Yoshiyama & Kimura, 2009; Yoshiyama et al., 2013). Инхибиторната активност срещу *Paenibacillus larvae*, която установихме е в съгласие и с изследването на Janashia и съавтори (Janashia, Choiset, et al., 2016), които откриват, че бактериоцин-продуциращи екзогенни бактериални щамове *Enterococcus durans* A5-11, *Enterococcus faecalis* KT2W2G и *Lactobacillus lactis* подвид *lactis* KT2W2L проявяват инхибиторно действие срещу два щама *Paenibacillus larvae*.

След първоначалният анализ по отношение на антибактериална активност срещу индикаторни щамове, продължихме работа с избрани щамове (27 бр.) селектирани въз основа на демонстрираната от тях протеолитична и бактериоцинова активност. На тези щамове при неутрализиране на супернатантите чрез третиране с NaOH установихме, че те притежават леко кисел диапазон със стойности на рН от 5 до 5,5. Може да бъде направено предположението, че при анализираниите от нас щамове има наличие на бактериоциноподобни белтъчни субстанции притежаващи инхибиторна дейност срещу индикаторните щамове. В подкрепа на тази хипотеза е наличието на антимикробна активност проявена от изолатите на *Enterococcus*, която беше загубена след третиране с протеиназа К, като по този начин потвърдихме белтъчната природа на субстанцията отговорна за инхибирането (Dal Bello et al., 2010).

На подбраните от нас 27 бр. щама извършихме последващо определяне на видовата им принадлежност посредством секвениране на гените за 16S РНК. След идентифициране на изолатите установихме, че основно принадлежат на: *Lactiplantibacillus plantarum*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Levilactobacillus brevis*, *Rosenbergia*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Serratia*, *Staphylococcus equorum* и *Staphylococcus saprophyticus* (табл. 8). В литературата има редица проучвания, съобщаващи за антибактериална активност от тези видове, както и други (напр. *Enterococcus columbae* и *Enterococcus casseliflavus*), които не са идентифицирани в нашето изследване (Butaye, Baele, Devriese, & Haesebrouck, 2002; Poeta et al., 2007; Sabia, Messi, de Niederhausern, Manicardi, & Bondi, 2004). Сред 335-те щама, 9 бр. показаха активност срещу *Listeria monocytogenes*. Важно е да се подчертае,

че 5 изолата показаха голяма зона на инхибиране (>10 mm). Повечето ентерококови бактериоцини притежават способността да инхибират растежа на *Listeria* (Cocolin, Foschino, Comi, & Grazia Fortina, 2007; Pinto et al., 2009; Rivas, Castro, Vallejo, Marguet, & Campos, 2012), като тази способност се свързва с близката филогенетична връзка на ентерококите и *Listeriae*. Щамовете от род *Enterococcus*, които притежават антилистериална активност, поради производството на бактериоцини, са от изключително важно значение за хранително-вкусовата и млечната промишленост (De Vuyst, 2003). Тридесет и три изолата демонстрираха активност срещу *Enterococcus faecalis*, с голяма наблюдавана зона на инхибиране проявяваща се при 9 от ентерококовите изолати. По отношение на *Staphylococcus aureus*, 17 изолата демонстрираха инхибиращ ефект. Rivas и съавтори съобщават, че тези два вида са чувствителни към ентерококови бактериоцини (Rivas et al., 2012). Общопризнато е, че инхибиторната активност на ентерококовите бактериоцин обхваща грам-положителните бактерии, включително *Listeria monocytogenes*, но показва ограничена или липса на активност срещу грам-отрицателните (Banwo, Sanni, & Tan, 2013), поради външната им мембрана.

В нашето изследване 13 изолата демонстрираха инхибиторна активност срещу *Paenibacillus larvae*. Тези резултати притежават възможно биотехнологично приложение, особено като се има предвид, че родът *Enterococcus* е част от микробиома на храносмилателния тракт на медоносната пчела (Carina Audisio, Torres, Sabate, Ibarguren, & Apella, 2011). Предполага се, че бактериоцин- продуциращите изолати стимулират реакция на вродения имунитет при медоносните пчели, което може да бъде от полза за предотвратяване на бактериални заболявания при пчелите. При изолатите от пчелни продукти, насочихме своето внимание към три изолата, показали по-широки зони на инхибиторна активност срещу *Paenibacillus larvae* (>10 mm), при които като резултат от подравняването с помощта на BLAST на техните 16S rRNA генни последователности установихме, че два от тях принадлежат към *Enterococcus faecium* и един към *Enterococcus durans*. Щамовете произхожда от малка пчелна ферма в с. Душанци – предпланински регион характеризиращ се както с добре развито земеделие, така и със запазени естествени природни региони в околностите. Тези идеални условия за развитие на пчеларството благоприятстват просперитета на няколко малки пчелни ферми в околността. За съжаление, в някои от тях са документирани случаи на заболяването Американски гнилец през последните години.

С цел детайлно по-охарактеризиране на двата изолата *Enterococcus faecium* извършихме целогеномно секвениране. Допълнителните анализи на последователностите на данните от получените резултати показаха, че изолатите са клонално идентични, т.е. и двата принадлежат към един и същи щам, който нарекохме *Enterococcus faecium* EFD. Всички следващи изследвания извършихме само на един от изолатите. С помощта на софтуерът QCAST направихме оценка на метриците на генерираните драфт асемблирани геноми, което доведе до следните резултати: обща дължина от 2 611 074 б.д., N50 от 98 462 б.д, GC съдържание 38,03% и 69 контига, по-големи от 1000 б.д. Тези стойности са в съгласие с тези на публично достъпните геноми на *Enterococcus faecium* на NCBI.

Генерираните геномни данни ни позволиха едновременно извършване на различни видове анализи необходими ни с цел определяне дали този щам може да се счита за безопасен. Всички резултати са обобщени в табл. 5. В резултат на извършеният скрининг за наличие на генетични детерминанти на бактериоцини можем да кажем, че антибактериалната активност на *Enterococcus faecium* EFD може да бъде резултат от активността на един или повече от петте открити бактериоцина: бактериоцин 32, ентероцин А, ентероцин Р, ентероцин SE-K4 и ентеролизин А. Чрез целогеномното секвениране не може да се каже със сигурност кои от тях са отговорни за инхибиторната активност срещу тестваните щамове, особено срещу *Paenibacillus larvae*. Изследователска група, извършила масов скрининг на 300 бактериоциногенни ентерококови щамове, съобщава, че ентероцин А и enterocin Р в комбинация, или самостоятелно, инхибират растежа на *Paenibacillus larvae* (Jaouani et al., 2014). Техните открития подчертават наличието на ентероцин А и ентероцин Р (в комбинация или не) като най-вероятното обяснение за наблюдаваната антибактериална активност. Поради факта, че видовете *Enterococcus faecium* са известни с дуалистичната си природа, извършихме допълнително проучване дали *Enterococcus faecium* EFD е възможно да попадне в категорията GRAS (генерално считан за безопасен). Първата стъпка беше да извършим проверка в неговият геном за наличие на гени за антибиотична резистентност. С помощта на софтуерът Res-Finder3.2 установихме, наличието на ген *msr(C)* (генът придава резистентност към еритромицин и други макролидни антибиотици), както и на ген *aac(6')-Ii* (придаващ резистентност към някои аминогликозиди). Въпреки това и двете детерминанти за устойчивост нямат клинично значение, поради факта, че се считат за присъщи за вида *Enterococcus faecium*. Като допълнение и двата гена са с известни

хромозомни местоположения, което значително намалява риска от хоризонтален генен трансфер към други бактерии чрез конюгация. Предвид този факт, тези детерминанти не трябва да се разглеждат като потенциална причина за отнемане на статута за безопасност. С цел проверка на получените от нас резултати чрез *in silico* анализ, извършихме допълнителен *in vitro* анализ за проверка резистентността на щаму срещу всички класове клинично важни антибиотици. Резултатите показаха, че щамът *Enterococcus faecium* EFD е податлив на ампицилин, имипенем, ципрофлоксацин, левофлоксацин, гентамицин, тейкопланин, ванкомицин, линезолид и тигециклин, и устойчив само на еритромицин, като последното е в голяма степен присъщо за вида (Hollenbeck & Rice, 2012).

С помощта на инструментът VirulenceFinder 2.0 извършихме допълнителен биоинформатичен анализ, чрез който установихме наличието на два гена, които могат да се разглеждат като детерминанти на вирулентност – *act* и *efaA*, кодиращ Act колаген-свързващ протеин и ендокардит-специфичен антиген А. Въпреки това, подробен анализ на последователността показва, че в рамките на *act* CDS има наличие на мутация с изместване на рамката на четене на позиция 507 (от общо 1865 б.д.), както и допълнителни 18 базови субституции. Мутацията с изместване на рамката на четене предполага единствено нефункционален белтък. Броят на нуклеотидните замествания установени в *efaA* е 53, заедно с 4 индел-а, засягащи белтъчния продукт чрез добавяне на две парчета от 23 и 9 аминокиселини на позиции 45 и 726 на гена. След като анализирахме с BLAST транслацията на белтъка, не открихме наличие на клинични щамове, което предполага променена белтъчна функционалност. Допълнителен анализ с инструмента PlasmidFinder показва, че само един от контигите с бактериоцинови гени (кодиращи бактериоцин 32) е свързан с последователност, свързана с плазмидна репликация. Това води до предположението, че генетичните детерминанти от другите четири бактериоцина могат да бъдат хромозомно разположени и по този начин стабилно унаследени.

Цялостното заключение от проведените анализ със софтуера за вирулентност показва, че изолатът *Enterococcus faecium* EFD няма функционални патогенни черти и следователно не трябва да се счита за потенциален патоген. Наличието на *act* и *efaA* гени предполага, че изолатът може да е възникнал от животинско замърсяване, като с течение на времето, в рамките на кошерната среда и в отсъствието на специфичен селективен натиск за поддържане на неговите патогенни свойства, той се превръща в

непатогенен чрез натрупване на мутации в тези детерминанти. Това е в подкрепа на нашата хипотеза за дългосрочната устойчивост на изолата в пчелния кошер като част от нормалния му микробиом.

Продължихме своето проучване с цялостно молекулно и фенотипно характеризиране на щам *Enterococcus durans* EDD2, произхождащ от свежо събрани поленови гранули, притежаващ пробиотични характеристики и също проявяващ инхибиторна активност срещу *Paenibacillus larvae*. Доколкото ни е известно, това е първото по рода си изследване на изолиран от пчелни кошери бактериален изолат, притежаващ полезни свойства и допълнително подложен на целогеномно секвениране.

Интересен е фактът, че кошерите от които беше изолиран EDD2 бяха характеризирани от собственика на пчелната ферма като добри и проспериращи. Резултатите показват, че изолатите от *Enterococcus durans* не са многобройни – те заемат трето място по численост. Като цяло, в чревни проби от медоносни пчели групата *Enterococcus* се среща значително по-рядко в сравнение с лактобацилите (Janashia, Carminati, et al., 2016). Въпреки това, фактът, че поне в половината от кошерите, от които беше изолиран щамът, той е преобладаващ (в два от три и в три от три изолата респективно) беше първия индикатор за наличие на селективна поддръжка в кошера от страна на щамът.

Хуморалният отговор е най-важната защитна система при медоносната пчела и се управлява от производството на антимикробни пептиди като апидаецин, абаецин, хименоптецин и дефензин. Тези съединения действат чрез ограничаване на ензимите необходими за растежа и размножаването на патогените образувайки канали в клетъчните мембрани на патогенните микроорганизми (Iorizzo et al., 2022). В проучване относно инхибиране на *Paenibacillus larvae* от МКБ изолирани от ферментирали продукти, Yoshiyama и съавтори съобщават, че след перорално приложение на няколко вида, принадлежащи към родовете *Enterococcus*, *Weissella* и *Lactobacillus* от ларви и възрастни пчели, нивата на транскрипция на антимикробни пептиди като абаецин, дефензин и хименоптецин се увеличават значително. Това предполага, че избраните МКБ стимулират вродения имунен отговор на медоносните пчели, което може да бъде от полза при предотвратяване на бактериални заболявания (Yoshiyama et al., 2013).

Може да бъде направено предположението, че четирите кошера от които беше изолиран *E. durans* EDD2 може да се приемат за предпазени от заболяването

американски гнилец. Към тази хипотеза могат да бъдат включени и другите два кошера в които бяха открити неопределените изолати от род *Enterococcus* притежаващи активност срещу *Paenibacillus larvae*, но поради обстоятелството, че са по-малко на брой няма солидна основа за спекулации по отношение на селективна защита. Потвърждаването на еднакъв щам в нашето проучване предполага споделяне на протективни щамове в съседни кошери в пчелната ферма, което би улеснило третирането на компактни пчелни семейства за предпазване от американски гнилец и подобни заболявания. В подкрепа на тази хипотеза е липсата на заболявания в кошерите, обект на нашето проучване, за разлика от останалите съседни. Споделянето на протективни щамове при медоносните пчели може да се дължи на факта, че взаимодействията между индивиди от една и съща колония предоставят възможности за прехвърляне на чревни бактерии - в тези насекоми са открити някои от най-отличителните и консистентни чревни микробиоми притежаващи протективни функции (Ramos, Basualdo, Libonatti, & Vega, 2020). Пчелният микробиом се придобива по вертикален път и се предава от различни източници в околната среда. Общностите МКБ и тяхното разнообразие варират в зависимост от пчелната активност (Vásquez, Olofsson, & Sammataro, 2008). Следователно може да се приеме, че някои МКБ асоциирани с медоносните пчели (*Apis mellifera*) се предават от околната среда, докато други се унаследяват вертикално по майчина линия (McFrederick et al., 2012). Функционални изследвания на чревният микробиом на *Apis mellifera* чрез метагеномен анализ показват възможна връзка на МКБ със защитата на пчелите срещу патогени (Mohammad, Mahmud-Ab-Rashid, & Zawawi, 2021).

Присъствието на *Enterococcus durans* EDD2 може лесно да бъде отдадено на човешко и животинско фекално замърсяване предадено на пчелите. В проучване относно наличие на мултирезистентни ентерококи в животинско месо и фекалии и възможност за трансфер на резистентност от *Enterococcus durans* към човешки *Enterococcus faecium*, Pasquaroli и съавтори предоставят допълнителни доказателства за честата поява на ентерококи устойчиви към множество медикаменти при селскостопански животни и продукти. Авторите подчертават, че чревни ентерококи, включително *Enterococcus durans*, от животински произход са по-предразположени, в сравнение с ентерококите с хранителен произход, за прехвърляне на антибиотична резистентност към човешки щамове (Vignaroli, Zandri, Aquilanti, Pasquaroli, & Biavasco, 2011). В проби от мед също има открити антибиотици поради факта, че те се използват в пчеларството за лечение на

бактериални заболявания. Антибиотичните остатъци произхождат предимно от околната среда и са следствие на неправилни пчеларски практики. В проби от мед има открити остатъци от окситетрациклин и хлорамфеникол над регулаторните стандарти (Al-Waili, Salom, Al-Ghamdi, & Ansari, 2012; Saridaki-Papakonstadinou, Andredakis, Burriel, & Tsachev, 2006). Окситетрациклинът обикновено се използва за лечение на европейски и американски гнилец - болести, причинени от ларви на бактериите *Paenibacillus (Bacillus)* и *Streptococcus pluton*. Поради широката си употреба, има съобщения и за резистентност към тетрациклин. Други антибиотици като еритромицин, линкомицин, монензин, стрептомицин и енрофлоксацин също се използват (Al-Waili et al., 2012).

За да проверим хипотезата за наличие на микробно замърсяване, щамът беше подложен на тестове за наличие на фактори на вирулентност, както и на антибиотична резистентност. Всички извършени тестове бяха отрицателни и щам *Enterococcus durans* EDD2 беше класифициран като напълно безопасен. Тези открития, в комбинация с неговата активност срещу *Paenibacillus larvae* са в противоречие с вероятността за случайно попадане на щама в кошерите. Следователно, щамът следва да бъде считан за селективно поддържан и притежаващ пробиотични свойства.

Голяма част от МКБ произвеждат антибактериални пептиди, включително бактериоцини, чиито механизъм на действие е насочен към унищожаване на целевите клетки чрез образуване на пори и/или инхибиране на синтеза на клетъчната стена. Бактериоцините проявяват антимикуробна активност с променлив спектър в зависимост от пептида, който може да е насочен към няколко бактерии. Съществуват научни доказателства, че бактериоцините са ефективни срещу някои бактериални инфекции при медоносните пчели (Iorizzo et al., 2022). Съобщава се за наличие на производство на бактериоциноподобни инхибиторни субстанции при някои щамове *Enterococcus*, изолирани от червата на медоносната пчела (Janashia, Choiset, et al., 2016).

Подложихме щама EDD2 на целогеномно секвениране, с цел откриване на наличието на продуцирани от *Enterococcus durans* EDD2 бактериоцини, както и генетичните им детерминанти. Геномното секвениране на *Enterococcus durans* EDD2 беше извършено от BGI Genomics Company (BGI, Китай) чрез  $2 \times 150$  б.д. вдвоено геномно секвениране на Illumina HiSeq. В резултат получихме 4 370 827 бр. необработени двойки за четене, които обработихме с помощта на онлайн платформата Galaxy (Afgan et al., 2018). Така прочетените базови двойки проверихме след това с



FastQC и накрая използвахме Trimmomatic (Bolger, Lohse, & Usadel, 2014) за премахване на адаптерите и премахване на последователностите с нисък Phred резултат. Първоначалното *de novo* асемблиране на обработените рийдове беше извършено с помощта на платформата Shovill, като зададените настройки бяха по подразбиране. Преди асемблирането, рийдовете бяха взети на случаен принцип до приблизително 100 × покритие. Асемблираният геном се състоеше от 139 контига с размери по-големи от 500 б.д. (най-големият контиг беше 155 300 б.д.). Чрез анализ с QUAST (Gurevich, Saveliev, Vyahhi, & Tesler, 2013) установихме, че геномът е съставен от 2 961 262 б.д. със средно съдържание на GC от 37,71% и стойност на N<sub>50</sub> от 57 760 б.д. След това подравнихме сглобените контиги спрямо генома на *Enterococcus durans* KLDS6.0930 (GCA\_001267865.1) с помощта на прогресивния алгоритъм Mauve (Darling, Mau, Blattner, & Perna, 2004). Избрахме геномът на *Enterococcus durans* KLDS6.0930 като референтен поради неговите пробиотични свойства и достъпността на пълната геномна последователност на този щам (Liu et al., 2016). Подравняването на двата генома (чрез Mauve) показва цялостна връзка между тези две последователности. Допълнително извършихме анализ с MiGA (Rodriguez et al., 2018), чрез който установихме, че избраният геном на *Enterococcus durans* KLDS6.0930 е най-сродният представител в базата данни на този инструмент. Двата генома притежават средна нуклеотидна идентичност (ANI) от 99,71% и споделят 91,6% от своите белтъци със средна аминокиселинна идентичност (AAI) от 99,76%. Проектната геномна последователност на *Enterococcus durans* беше анотирана помощта на инструментът за анотации на прокариотния геном (PGAP) на NCBI (Tatusova et al., 2016), който съдържа 2648 гена кодиращи протеини, 3 пълни рРНК генни клъстера (5S, 16S, 23S) и 62 тРНК гена. В допълнение, в два контига идентифицирахме наличие на последователности свързани с репликация на плазмиди чрез инструментът PlasmidFinder (Carattoli et al., 2014). Като се има предвид, че ентерококите се считат за опортюнистични човешки патогени (Kirschner et al., 2001), извършихме оценка на резистома и вирулома на *Enterococcus durans* EDD2 с помощта на ResFinder 3.2 и VirulenceFinder 2.0 (Clausen, Aarestrup, & Lund, 2018). Установихме наличието на генетични детерминанти на бактериоцини чрез платформата BAGEL4 (van Heel et al., 2018), с помощта на която разкрихме два предполагаеми клъстера за продуциране на варианти на Enterocin L50A и Enterocin P.

Извършеният в последствие анализ показва два предполагаеми клъстера за enterocin L50A/L50B (фиг. 3) и enterocin P (фиг.4), локализирани съответно на контиг 48

и контиг 49. С помощта на BLAST инструмента определихме степента на сходство на секвенциите между новите предполагаеми бактериоцини открити в *Enterococcus durans* EDD2 и техните референтни аналози (enterocin L50A/L50B и enterocin P) (L. M. Cintas et al., 1998; Cintas et al., 1997). Наличието на enterocin L50A/L50B и enterocin P е сравнително често срещано явление в бактериоциногенните ентерококи. Audisio и съавтори (Audisio & Benitez-Ahrendts, 2011) съобщават за щам *Enterococcus faecium* изолиран от стомашно-чревния тракт на пчели-работнички, който съдържа enterocin A, enterocin B и enterocin P генетични детерминанти, определени с помощта на ПВР. Всъщност, *in vitro* щамът инхибира растежа само на *Listeria monocytogenes*, но не и на *Paenibacillus larvae*. При друго проучване, за няколко щамове *Enterococcus faecalis* и *Enterococcus faecium* се съобщава, че притежават генетични детерминанти за enterocin L50A/L50B, enterocin P и enterocin A, отделно или в комбинация, които инхибират растежа на *Paenibacillus larvae* (Jaouani et al., 2014). В същото изследване е посочено, че един щам *Enterococcus durans* притежава генетични детерминанти за enterocin P и enterocin A, и инхибира растежа на *Paenibacillus larvae*. В изследването на Jaouani и колектив нито един от ентерококовите щамове не е изолиран от пчели или пчелни продукти. В двете цитирани по-горе проучвания, наличието на генетични детерминанти е определено само с помощта на ПВР. Поради факта, че не са извършени експерименти относно дефинирането на последователности или по отношение на експресията, не може да се каже кои бактериоцини имат отношение към инхибирането на растежа на *Paenibacillus larvae*. Двата изследователски екипа са извършили при своите опити само размножаване на структурни гени, като при второто проучване има наличие на различни комбинации от бактериоцини. Най-логичното заключение би било, че всички бактериоцини биха могли да бъдат потенциални инхибитори на растежа на *Paenibacillus larvae*, но не би могло да се установи със сигурност кой от тях има роля за това. Допълнително, съществува голяма вероятност някои от гените да бъдат в мутантна форма или да не бъдат експресирани.

Благодарение на изборът ни да работим с новогенерационните технологии, можем да заявим, че генетичните клъстери за ентероцини L50A/L50B и P намиращи се в *Enterococcus durans* EDD2 са цялостни и съдържат всички необходими гени за тяхната експресия. Наблюдаваната активност срещу *Paenibacillus larvae* може да бъде резултат от един от тях, двата едновременно или да е синергична. Въпреки това, интересното откритие по отношение на старт кодона (АТТ) в структурния ген за enterocin P е

необичайно, както и субституцията на три аминокиселини – откритие, което позволява широк спектър от предположения по отношение на експресията, както и на активността срещу *Paenibacillus larvae*, които остават обект на бъдещи проучвания.

Доколкото ни е известно, *Enterococcus durans* EDD2 е първият изолат на този вид, свързан с пчелен кошер, който продуцира бактериоцини активни срещу *Paenibacillus larvae*. Предишно проучване съобщава за изолирането на един щам *Enterococcus durans* от червата на възрастни пчели работнички, но по-нататъшни изследвания показват липса на инхибиторна активност *in vitro* срещу *Paenibacillus larvae* (Janashia, Choiset, et al., 2016). В противовес на това, нашето проучване показва, че щамът EDD2 може да играе роля в защитата срещу инвазията на бактериални патогени, особено като се има предвид, че нашият анализ не откри в неговия геном наличие на фактори на вирулентност, или детерминанти на резистентност, към клинично важни антибиотици. В действителност, един щам е необходимо да притежава и други важни качества, за да се счита за пробиотик, като например да е непатогенен, генетично стабилен и жизнеспособен във високи популации. Като допълнение, щамът трябва да може да оцелее и пролиферира в силно агресивната среда на чревния тракт. Другите важни необходими характеристики включват адхезия и колонизация на чревни клетки, както и потенциални терапевтични ползи. Описаната от нас проектна геномна последователност ще позволи извършването на допълнителни анализи на тези свойства в геномен мащаб, което би ни помогнало да разберем по-добре биологичната роля на ентерококите в медоносните пчели и техните колонии.

Този геномен проект е депозиран в DDBJ/ENA/GenBank под номер JAAILD000000000.

Резултатите от нашето проучване показаха, че няколко изолата от зелено сирене също притежават протеолитична и бактериоцинова активност. Предвид фактът, че до сега няма извършвани проучвания по отношение на микробиома на този изключителен български продукт, ние подложихме тези изолати на метагеномно изследване, за да установим и анализираме видовете микроорганизми, допринасящи за неговите отличителни характеристики, включително обонятелни и органолептични.

Уникалното зелено сирене притежава много интересна история - то дължи името си на цвета на своята кора и се произвежда по традиционна българска рецепта. Благородните плесени, които изграждат кората на продукта, не са умишлено

инокулирани, а се развиват самостоятелно. Въпреки че зеленото сирене се произвежда само в едно единствено населено място, то е известно в цялата страна благодарение на своя специфичен вкус и аромат.

В средата на 20 век се отбелязва спад в продукцията на сиренето. От една страна, това се обуславя от принудителната колективизация под натиска на тогава действащия комунистически режим. Своята роля в този процес изиграва и тогава действащата забрана за комерсиализация на млечни продукти състоящи се от сурово мляко, които са били ограничени само в рамките на домашната употреба. Тези обстоятелства обясняват липсата към днешна дата на научни изследвания на зеленото сирене от с. Черни Вит.

Предвид трудните времена в средата на миналия век, продукцията тогава е в много ограничен мащаб, но днес се наблюдава завишен интерес, особено от „гурме“ ресторантите, където зеленото сирене се сервира като деликатес. Тези обстоятелства обясняват нуждата от провеждане на настоящото проучване. Неговата необходимост допълнително е мотивирана от факта, че този традиционен продукт може да бъде считан за национално културно наследство.

Зеленото сирене се произвежда само в с. Черни Вит, общ. Тетевен, намиращо се в северния предпланински регион на Стара планина. Предполага се, че спецификата му се дължи на два фактора. Първият от тях е своеобразния микроклимат. Селото е разположено в тясното ждрело на р. Черни Вит, извираща от върха на планината. Това прави въздухът относително постоянно влажен през цялата година. Зимите са доста студени, докато лятото е свежо, въпреки континенталния климат. Вторият фактор е, че в миналото някои от основните икономически дейности в региона са разчитали на овцевъдството за производство на вълна и мляко.

Българското зелено сирене е тип твърдо, с кора от благородни плесени. Произвежда се от сурово мляко - предимно овче, понякога и козе. По принцип не се прави от краве мляко, тъй като то има ниска масленост и белтъчно съдържание. Основните му специфики са, че като изходна суровина се използва непастеризирано мляко непосредствено след издояване, което обяснява ролята на местния микробиом за получаване на отличителните характеристики на крайния продукт. Също така, ключова стъпка в процеса е добавянето на малко количество традиционно българско кисело мляко по време на узряването.

В това проучване, имащо за цел характеризирането на българското зелено сирене, като първа стъпка предприехме метагеномно изследване, основано на секвениране от следващо поколение. Проучването обхваща региони V3-V4 от 16S PНК гена (Claesson et al., 2010) при бактериални видове и ITS2 при гъби (Alanagreh, Pegg, Narikumar, & Buchheim, 2017). Използваната методология е стандартна, като в последните години има публикувани редица научни проучвания, касаещи както занаятчийски, така и индустриално произведени сортове сирена, които са типични за даден регион (Ianni et al., 2020; Marino et al., 2019; Papademas et al., 2019). Към днешна дата, все още няма публикации в научната сфера за извършен метагеномен или друг подобен микробиомен анализ на българското зелено сирене.

Въпреки установените уникалните етикети и таксономично присвоените ОТЕ, не открихме значителни разлики в броя видове между четирите партии. Това относително изобилие от видове в събщността е типично за сирената приготвени от сурово мляко без стартерни култури (Dugat-Bony et al., 2016).

На фиг. 19А е показано сравнителното изобилие на еубактериални типове в четирите партии зелено сирене. На фиг. 17 е представено комбинирано филогенетично дърво с изобразено относително разпределение на 20-те преобладаващи бактериални вида, а на фиг. 20А е представена топлинната карта съдържаща таксономичното разнообразие. Тези стойности не могат да бъдат приети за напълно точни поради факта, че технологията за секвениране от следващо поколение използва стъпка на намножаване на фрагменти чрез ПВР, която не подлежи на точна количествена оценка. Въпреки това, те дават добра представа за видовия бактериален състав. Firmicutes заемат първото място с повече от 50% присъствие, следвани от Actinobacteria с малко повече от 40% и на трето място са Proteobacteria с около 6%. Останалите бактериални типове са представени в незначителни количества. Тези открития са в съответствие с други описани в литературата (Dugat-Bony et al., 2016) и по-специално с проучвания касаещи повърхностно-зрели твърди сирена (Escobar-Zepeda, Sanchez-Flores, & Quirasco Baruch, 2016). В проучване относно връзката между микробиомът и метаболитите в меко узряло сирене с помощта на интегриран omics подход, Unno и съавтори установяват, че почти всички проби от сирене са доминирани от Firmicutes, Proteobacteria и Actinobacteria (Unno, Suzuki, Matsutani, & Ishikawa, 2021). При сиренето Poro, което е тип занаятчийско, Mazorra-Manzano и съавтори съобщават, че преобладават типовете Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria и Bacteroidetes. След ферментацията е установено, че типът

Firmicutes доминира, следван от протеобактерии и актинобактерии (Aldrete-Tapia, Escobar-Ramirez, Tamplin, & Hernandez-Iturriaga, 2014; Mazorra-Manzano et al., 2022). Lusk и съавтори съобщават, че при проведено изследване на различни марки латински тип сирена (напр. queso fresco) Firmicutes доминират във всички проби от сирене, следвани от Proteobacteria (Lusk et al., 2012).

В рамките на типа Firmicutes на родово и видово ниво на първо място, с повече от 30%, се нареждат грам-положителните млечнокисели бактерии (МКБ) от родове *Streptococcus*, *Lactobacillus* и *Lactococcus*. Те са следвани от представители на рода *Staphylococcus* (около 18%). Въпреки че зеленото сирене е продукт без стартерна култура, неговото производство включва добавянето на традиционно българско кисело мляко. Тази стъпка би могла да обясни наличието на първо място на *Streptococcus salivarius* подв. *thermophilus* (около 21% от МКБ). Отсъствието обаче на другият щам „стартер“ за кисело мляко *Lactobacillus delbrueckii* е доста изненадващо предвид факта, че сред млечнокиселите бактерии лактобацилите излизат на второ място с почти 7,5% и са представени от 6 различни вида. *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus* е един от преобладаващите млечнокисели бактериални видове, използвани като стартерни култури в промишленото производство на ферментирани млечни продукти (Dan et al., 2019). Изследване на хранителни отпадъци чрез пиросеквениране разкрива, че видовете *Lactobacillus* са доминиращи в изследваните микробиоми и имат ключова роля при ферментацията (Tsapekos, Alvarado-Morales, Baladi, Bosma, & Angelidaki, 2020). Предвид това, може да се каже, че това е особеност при българското зелено сирене.

Видовете от р. *Lactococcus* са третата основна МКБ група с 3,7% и три вида. По-слабо представените родове МКБ са *Leuconostoc*, *Weissella*, *Marinilactibacillus* и *Enterococcus*. Сред Грам-положителните бактерии родът *Staphylococcus* също е добре представен, най-вече от вида *Staphylococcus equorum*. Намерените Грам-отрицателни бактерии са в незначителни количества и сред тях най-представените родове са *Veillonella* и *Selenomonas*. Докато различните видове *Lactobacillus*, *Leuconostoc* и *Enterococcus*, както и *Lactococcus lactis* и *Streptococcus salivarius* подв. *thermophilus* имат основна роля за узряването на сиренето и тяхното присъствие е очаквано, присъствието на някои видове *Staphylococcus*, както и от наличието на *Lactococcus garvieae* предизвиква известни опасения. Важно е да се отбележи, че видът *Staphylococcus equorum* е коагулазно-отрицателен, поради което се счита, че бактерията е доброкачествена и също така няма налични в литературата доказателства за евентуална

нейна патогенност (Jeong, Neo, Ryu, Blom, & Lee, 2017). Има информация за шам, изолиран от саламура от сирене и произвеждащ анти-листериален бактериоцилин (Bockelmann et al., 2017). Това наблюдение индикира възможност наличието на *Staphylococcus equorum* да бъде отчетено и като предимство. За другите наблюдавани коагулазно-отрицателни видове, като *Staphylococcus lentus* също има налични литературни данни, че са типични микроорганизми в някои турски сирена (Kurekci, 2016). Друг вид, който може да предизвика безпокойство, е *Lactococcus garvieae*, който е добре известен рибен патоген. Скорешни проучвания показват, че този вид е част от типичната микрофлора на някои испански сирена, приготвяни със сурово мляко и без използване на стартерна култура (Fernández, Alegría, Delgado, & Mayo, 2010). *Lactococcus garvieae* също преобладава в някои занаятчийски италиански сирена и допринася за техните характеристики (Fortina et al., 2007). Някои автори дори приписват на някои щамове пробиотични свойства, поради факта, че могат да инхибират растежа на патогени като *Staphylococcus aureus* (Abdelfatah & Mahboub, 2018). Известно е, че сред грам-отрицателните видове Firmicutes *Veillonella* е част от нормалната чревна и устна лигавица на бозайниците. Родът е открит в занаятчийско италианско алпийско сирене „Plaisentif“ с помощта на метагеномни изследвания (Dalmasso et al., 2016), където ролята му се свързва с ферментацията на лактат. На този етап, не биха могли да се правят обосновани предположения за положителна роля на другия представител на род *Selenomonas*, а именно *Veillonellaceae*. Това е типична бактерия, която играе роля в храносмилането на преживните животни и нейното присъствие трябва да се разглежда като опасно замърсяване.

Actinobacteria се нарежда на второ място, представено най-вече от родовете *Brevibacterium* и *Corynebacterium*, както е описано за други сирена (Dugat-Bony et al., 2016). Съществуват литературни данни, че видовете *Brevibacterium* могат да бъдат открити в изобилие в кората на твърдите сирена. Също така, те могат да играят значителна роля в разграждането на хистамините, които могат да се образуват по време на ферментацията, като ги използват като източник на въглерод (Anast et al., 2019). Подобна роля за видовете *Corynebacterium* се съобщава от Tittarelli и съавтори (Tittarelli, Perpetuini, Di Gianvito, & Tofalo, 2019), докато Gori и колектив откриват, че те обикновено са преобладаващите повърхностни бактерии по време на узряването на няколко вида сирена и допринасят за структурата, вкуса и цвета на сиренето (Gori, Ryssel, Arneborg, & Jespersen, 2013). Наблюдавано е малко, но забележимо количество

*Kocuria rhizophila*, като някои автори съобщават, че този вид може да подобри образуването на летливи съединения и по този начин да допринесе за специфичния вкус на сиренето (Centeno, Garabal, Docampo, Lorenzo, & Carballo, 2017). Останалите представители на типа са незначително представени, така че те не биха могли да играят съществена роля в качеството на сиренето.

Третият бактериален тип, който беше значително представен, беше Proteobacteria с две семейства - *Halomonadaceae* и *Moraxellaceae*. Първото беше представено главно от *Cobetia marina* и малък, но забележим брой *Halomonas venusta*, докато второто беше представен от *Psychrobacter celer*. Ролята на *Cobetia marina* е доста неясна, но нейното наличие е установено в млекопреработвателните предприятия (Schön et al., 2016). По литературни данни *Psychrobacter celer* е свързан с някои френски и белгийски видове сирена, но към днешна дата няма наличие на клинични инфекции свързани с тази грам-отрицателна бактерия (Delcenserie et al., 2014; Imran et al., 2019). Съществува информация, че *Halomonas venusta* заедно с *Psychrobacter celer* и *Vibrio* (което също беше открито от няколко ОТЕ прочита) са част от микробиома на някои добре познати в цял свят зрели видове сирена (Mounier, Coton, Irlinger, Landaud, & Bonnarme, 2017), но тяхната роля в узряването на сиренето остава неясна. От останалите незначително представени Proteobacteria, наличието на *Marinobacter* е установено в някои белгийски сирена с кора заедно с гъби *Dabaryomices* (Vermote, Verce, De Vuyst, & Weckx, 2018), аналогично на зеленото сирене. Два други рода *Haemophilus* и *Neisseria*, съдържащи човешки патогени, бяха открити с няколко ОТЕ прочита, но има данни за тяхното присъствие в отлежало сирене Гауда (Salazar et al., 2018). Наличието на останалите три Грам-отрицателни патогена, открити в малък брой - *Escherichia-Shigella*, *Cardiobacterium* и *Lautropia*, и наблюдавани в топлинната карта на фиг. 27А, може да се обясни най-лесно със замърсяване, защото зеленото сирене се приготвя от сурово мляко. Има литературни данни, че при произведени занаятчийски сирена по подобен начин от сурово мляко, останалите микроорганизми инхибират растежа на патогенните видове (Aldrete-Tapia, Escobar-Ramirez, Tamplin, & Hernandez-Iturriaga, 2018).

*Chryseobacterium* е единственият представител на род Bacteroides, който се нарежда сред 35-те рода, включени в топлинната карта на фиг. 20А. Няма литературни данни за наличие на клинични инфекции, причинени от някои от членовете на рода (Imran et al., 2019) и поради символичното му присъствие не е възможно да се правят предположения за участието му в процеса на узряване.



Почти всички (99,99%) от откритите видове гъби принадлежат на Ascomycota, представени почти еднакво от три класа: *Eurotiomyces*, *Sacharomycetes* и *Sordariomycetes* (Фиг. 17). Сред тях, първият клас е представен от един род и един вид - *Penicillium roqueforti*, който е и най-застъпеният гъбичен вид. Тази гъба е добре известна в производството на различни синьо оцветени сирена по целия свят. Доказано е, че *Penicillium roqueforti* допринася към специфичните характеристики на сирената чрез производството на много вторични метаболити, както и чрез неговите ефективна липолиза и протеолиза. Посредством тях се намалява активността на водата и по този начин се ограничава растежа на бактериите, развалящи продукта (Caron et al., 2020). Този вид също допринася за аромата и текстурата (Garcia-Estrada & Martin, 2016) на сирената. В случая с българското зелено сирене, шамът не се привнася умишлено в производствения процес, а се саморазвива подобно на испанското сирене Cabrales (M. Nunez, 1978; M. Nunez, Medina, Gaya, & Dias-Amado, 1981), като по този начин се отличава от други сини сирена като Рокфор, датско синьо, горгонзола и др. Това води до предположението, че наблюдаваният в нашия случай шам принадлежи към наскоро култивирани такива (Dumas et al., 2020).

*Sordariomycetes* е вторият по присъствие клас на Ascomycota, представен почти изцяло от *Scopulariopsis flava*, както и от минимални количества *Fusarium oxysporum* и *Trichothecium roseum*. В литературата има данни, че *Scopulariopsis flava* и *Fusarium oxysporum* са част от микробиома на сирена с богато мастно и протеиново съдържание (Ropars, Cruaud, Lacoste, & Dupont, 2012). *Trichothecium roseum* се съобщава и като подпомагащ плесенната формация и зреенето при някои сирена с твърда повърхност (Zamberi et al., 2016).

Сред класа *Sacharomycetes* най-голямо присъствие е отчетено на *Debaryomyces hansenii*, последван в намаляващ ред от *Pichia membranifaciens*, *Candida zeylanoides*, *Kluveromyces lactis* и *Torulasporea delbrueckii*. Непатогенните видове *Debaryomyces*, *Candida*, *Kluveromyces* и *Torulasporea* са съобщени в научната литература като гъбични видове подпомагащи процеса зреене при няколко вида френски сирена (Dugat-Bony et al., 2016). Съществува информация и за *Pichia membranifaciens* в някои ферментирани храни, например маслинови саламури (Carota et al., 2017), както и в египетско меко сирене (Moharram, A. Abd El Haleem, & R. S. Refaie, 2018).

Видът Zygomycota представлява само 0,01% от броя на отчетените оперативните таксономични единици при гъби, като са открити само родове *Circinella* и *Mucor* (най-

вече *Circinella muscae*). Ролята на тези дрожди в процеса на узряване на сиренето е дискуссионна и най-вероятно несъществена. Съществуват литературни данни за наличието на този вид дрожди и в други ферментирани храни (Walther et al., 2013). Обобщение на разпространението на наблюдаваните различни бактериални и гъбични видове е илюстрирано на фиг. 22 под формата на диаграма на Вен.

Въз основа на получената информация биха могли да се направят следните изводи: 1) има 68 бактериални и 9 основни вида гъби, които са необходими за узряването на всички от изследваните видове сирене; 2) има 25 бактериални и 4 вида гъби, необходими за узряването на поне три от видовете сирене; 3) има 26 бактериални вида и 6 вида гъби, необходими за узряването на поне два вида сирена; и накрая 4) всяка партида сирене се характеризира с от 5 до 25 специфични бактериални вида, докато само GC II, GC III и GC IV се характеризират специално с 1 до 2 вида гъби, като не са наблюдавани специфични за GC II гъбични видове.

Богатият микробиом на българското зелено сирене беше допълнително характеризирани чрез изследването на неговото алфа разнообразие. Индексите на Шанън и Симпсън са използвани за оценка на разнообразието въз основа на наблюдаваните ОТЕ, като първият дава по-голяма тежест върху видовото богатство, а вторият върху видовата равномерност (Kim et al., 2017). По отношение на стойностите на индексите при бактериалните видове и двата индекса имат близки стойности, с изключение на полутвърдото зелено сирене GC II, които стойностите бяха значително по-ниски. Това обстоятелство има връзка с факта, че по-малко на брой видове бяха наблюдавани в рамките на тази партида. При стойностите на индексите на Симпсън и Шанън при видовете гъби не се наблюдава такава зависимост - в 8-месечното овче твърдо зелено сирене се съдържат най-голям брой от наблюдаваните видове, докато стойностите на съответните индекси са на трето място. Двата индекса при видовете гъби са около 4 пъти по-високи за GC I и GC II в сравнение с партидите GC III и GC IV. Независимо от това, несъответствието при видовете гъби може да бъде обяснено отчасти с по-малкия брой на различните ОТЕ, както и по-малкото наблюдавано видово разнообразие, което води до по-голяма грешка в изчисленията.

С цел, проучване и сравняване на съставните съобщества от пробите в четирите партиди сирене, бяха анализирани индексите на бета-разнообразието с помощта на софтуера QIIME, използвайки разстоянията UniFrac. Изчислените коефициенти на различие по двойки, за претеглените и непретеглените измерители за разстояние Unifrac,

бяха използвани за изграждане на топлинни карти за бета разнообразието (фиг. 23). Най-високият коефициент на различие за претеглените разстояния Unifrac е наблюдаван между партидите GC II и GC III за бактериалния анализ и между партидите GC I и GC IV за анализа на видовете гъби. Най-ниските стойности на коефициентите са отчетени между партидите GC I и GC III и GC III и GC IV, съответно при бактерии и гъби. За непретеглените разстояния Unifrac, най-високи коефициенти на различие са наблюдавани между GC I и GC II (бактерии) и между GC III и GC IV (гъби), докато най-ниските са установени между GC II и GC III и съответно между GC II и GC IV респективно за бактерии и гъби.

Несъответствията между претеглените и непретеглените коефициенти на различие в рамките на четирите партиди от една страна, както и между бактерии и гъби от друга бяха визуализирани чрез провеждане на основен координатен анализ (PCoA) и основен компонентен анализ (PCA). Независимо дали бяха приложени претеглени или непретеглени Unifrac разстояния, не беше наблюдавано групиране дори поне при някои от пробите (резултатите не са показани).

По същият начин, конструираните UPGMA дървета за претеглените Unifrac (фиг. 24) и за непретеглените Unifrac (фиг. 25) разстояния при бактерии и гъби не предоставиха убедителна информация за свързаността между микробиома на четирите анализирани партиди сирене. Едно от най-правдоподобните обяснения за това е фактът, че българското зелено сирене се произвежда без използване на стартерна култура и при процеса на зреене основна роля имат микроорганизмите идващи от местната околна среда. Четирите партиди сирене се произвеждат от различни видове мляко (овче и козе) и в различни периоди от годината, което означава, че различните климатичните условия също се отразяват на екологичния микробиом. Важно е да се отбележи, че като цяло коефициентите на различие в бета разнообразието не са много високи, което означава, че този фактор също е повлиял на групирането и като цяло ни показва, че четирите анализирани вида сирена не са много различни, въпреки наблюдаването някои специфични видове за всеки от тях. В литературата вече е описан такъв сложен микробиом на сирене произведено от сурово мляко и разчитащо единствено на околната среда, особено по отношение на млечния микробиом (Tilocca et al., 2020), екологичния микробиом и приемствеността на микробните съобщества по време на процеса на узряване (Ceugniz et al., 2017; Escobar-Zepeda et al., 2016; Quijada et al., 2018).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение можем да кажем, че установихме способността на изолатите от род *Enterococcus*, изолирани от различни хранителни продукти подложени на естествена ферментация, да продуцират антибактериални субстанции за инхибиране растежа на патогенни микроорганизми, вкл. *Paenibacillus larvae*. Този резултат е многообещаващ и може да отвори широк хоризонт пред научната общност, работеща върху контрола на редица заболявания, включително заболяването американски гнилец при медоносните пчели. Необходими са допълнителни проучвания, които да потвърдят бактериоциновата природа на субстанциите инхибиращи индикаторните щамове. Разбира се, необходими са и *in vivo* експерименти, за да бъде установена приложимостта на това откритие.

Беше доказано, че *Enterococcus durans* EDD2 притежава силна инхибиторна активност срещу *Paenibacillus larvae*, което се дължи на продукцията на бактериоцини. Въпреки обстоятелството, че някои детайли касаещи експресията на бактериоцини остават неясни, щамът притежава доказан пробиотичен потенциал и може да се използва като алтернатива на антибиотиците, които понастоящем са единственият начин с помощта на който могат да бъдат третирани пчелните кошери. Ефектите на бактериоцин-продуциращите изолати от род *Enterococcus* при инфекция със заболяването американски гнилец *in vivo* трябва да бъдат допълнително проучени, за да се разбере тяхната пълна приложимост за защита на медоносните пчели от това заболяване.

Установихме, че целогеномното секвениране чрез новогенерационни технологии спестява време и ресурси при характеризиране на нови изолати притежаващи интересни пробиотични свойства, поради факта, че с помощта на тези технологии може да бъде събрано много голямо количество информация, позволяваща не само да се идентифицира наличието на структурни гени (полезни или причиняващи вирулентност и патогенност), но също така предоставят възможност за събиране на информация по отношение на техните генетични клъстери и оперони.

Извършихме първото метагеномно изследване на традиционното българско зелено сирене, произведено в с. Черни Вит. Този уникален млечен продукт е единственото българско сирене с благородна плесен. В резултат от проведените проучвания установихме, че зеленото сирене притежава богат микробиом, съдържащ предимно микроорганизми, които не са стартерни култури по своята природа и които от

своя страна допринасят за неговите отличителни характеристики, включително обонятелни и органолептични. Също така установихме, че присъствието на потенциални патогенни микроорганизми, типично за всички ферментирани млечни продукти от сурово мляко, е едва забележимо и най-вероятно не представлява риск за консумация - както поради изключително ниския брой ОТЕ, така и поради това, че са потиснати и нежизнеспособни, както е описано за други световноизвестни сирена (Salazar et al., 2018). Въпреки това, получените резултати в това първо проучване пораждаат нови въпроси и идеи за по-нататъшни анализи - най-важният от които е геномната характеристика на преобладаващите видове, особено на *Staphylococcus equorum*, *Lactococcus garvieae*, *Corynebacterium variable*, *Scopulariopsis flava*, различните наблюдавани дрожди и най-важното на *Penicillium roqueforti*, който е единственият култивиран щам на този вид, открит у нас. Евентуалното секвениране на целите микробиоми би позволило по-прецизна количествена характеристика на микробиомните съобщества, както и извършването на някои метаболомни анализи, необходими за характеризиране на крайния продукт.

## ОБОБЩЕНИЕ НА ПОСТИГНАТИТЕ РЕЗУЛТАТИ

**В резултат от нашата работа беше постигнато следното:**

- Създадена е колекция от 348 щамове;
- Разработена е система за съхранение на щамове на ниски температури;
- Разработена е система за таксономичното определяне на изолираните щамове въз основа на комбинация от микробиологични, молекулярно-биологични и геномни подходи;
- Извършено е идентифициране на генетични детерминанти на белтъчни молекули с антимикробна активност, както и тяхната експресия;
- Извършени са тестове за наличие на гени за антибиотична резистентност;
- Установена е бактериоцин-продуцираща дейност при някои от щамове;
- Установена е активност срещу *Paenibacillus larvae* в пчелните кошери при някои от щамове;
- Извършена е проверка за наличие на клонална свързаност между бактериоцин-продуциращите щамове;
- Извършен е анализ на получените данни от цялостно геномно секвениране на избрани бактериоцин-продуциращи щамове.

## ИЗВОДИ

Въз основа на извършената работа и анализи бяха формулирани следните изводи:

1. Ферментиралите функционални храни и в частност притежават значителен потенциал да са източник на пробиотични щамове бактерии от различни родове, показващи бактериоцинова активност срещу патогени (около 28% от всички изолати) и протеазна и пептидазна активност (около 7% от всички изолати), като има и такива, които показват едновременно бактериоцинова и протеазна и пептидазна активност (около 3% от всички изолати);
2. Антибактериалната активност на щамовете, изолирани от ферментирали функционални храни варира в широки граници: срещу 1 патогенен вид (около 42% от изолатите), срещу 2 патогенни вида (около 27% от изолатите), срещу 3 патогенни вида (около 7% от изолатите), срещу 4 патогенни вида (около 8% от изолатите), срещу 5 патогенни вида (около 7% от изолатите), срещу 6 патогенни вида (около 4% от изолатите), срещу 8 патогенни вида (около 3% от изолатите) и срещу всички 9 патогенни вида (около 1% от изолатите);
3. Бактериалната микробиота на черновитското зелено сирене се състои почти изцяло от Firmicutes (основно представители на родовете *Streptococcus*, *Lactobacillus* и *Lactococcus*), Actinobacteria (основно представители на родовете *Brevibacterium*, *Corynebacterium*) и в по-малки количества Proteobacteria (основно представители на родовете *Cobetia*, *Psychrobacter* и *Halomonas*);
4. Гъбната микробиота на черновитското зелено сирене се състои почти изцяло от Ascomycota (основно представители на родовете *Penicillium*, *Scopulariopsis* и *Debaryomyces*) и в по-малки количества Zygomycota (основно представители на родовете *Circinella* и *Mucor*);
5. Съставът на микрофлората на черновитското зелено сирене, макар и да показва обща структура, варира при различните изследвани проби, което може да бъде обяснено с факта, че ферментацията на сиренето зависи почти изцяло от микроорганизми, постъпващи от околната среда, както и от типа на използваното мляко (овче или козе);
6. Пчелните семейства в „добро здраве“ притежават значителен потенциал да са източник на пробиотични за медоносните пчели щамове бактерии, включително и такива, които инхибират патогенни бактерии;

7. Между пространствено близко разположени пчелни семейства се наблюдава обмен на пробиотични щамове;
8. На основата на цялостен геномен анализ на пробиотични щамове-продуценти на бактериоцини от р. *Enterococcus* с активност срещу причинителя на американски гнилец бе установено, че те притежават генетични детерминанти за синтез на повече от един вид бактериоцин, като твърде вероятно активността се дължи на синергизъм и/или на специфични варианти на ентероцини Р и А;
9. На основата на цялостен геномен анализ на пробиотични щамове-продуценти на бактериоцини от р. *Enterococcus* с активност срещу причинителя на американски гнилец бе установено, че те най-вероятно са продукт на вътрекошерна еволюция, тъй като са загубили по-голяма част от факторите на вирулентност и патогенност;
10. Цялостното новогенерационно геномно секвениране, съчетано с биоинформатичен анализ на онлайн-базирани платформи с безплатен достъп, се явява удобен, ценово оправдан, надежден и бърз начин за детайлен анализ и характеризиране на пробиотични щамове;
11. Ампликон-базираното метагеномно секвениране на проби, съдържащи комплексни микробиоти, съчетано с биоинформатичен анализ на онлайн-базирани платформи с безплатен достъп, се явява удобен, ценово оправдан, надежден и бърз начин за детайлен анализ и характеризиране на ферментирани функционални храни и някои други природни продукти, притежаващи собствени микробиоми.



## ПРИНОСИ

Научните приноси в настоящият дисертационен труд са следните:

1. За пръв път в България бе извършен ампликон-базиран метагеномен анализ на ферментирал млечен хранителен продукт – черновитското зелено сирене;
2. Бе доказано, че черновитското зелено сирене притежава специфична микробиота, като зреенето му зависи от специфичните условия в района на с. Черни Вит;
3. За пръв път в България бяха секвенирани геноми на пробиотични за пчелите щамове от р. *Enterococcus*;
4. Изолираните пробиотични щамове *Enterococcus durans* EDD2 и *Enterococcus faecalis* EFD могат да бъдат използвани като напълно естествена алтернатива за третиране на пчелни семейства, които са заразени с причинителя на заболяването американски гнилец – *Paenibacillus larvae*;
5. На основата на наличните генетични детерминанти при *Enterococcus durans* EDD2 и *Enterococcus faecalis* EFD, бяха установени кои са най-вероятните кандидати за бактериоцини с активност срещу *Paenibacillus larvae*.

## ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

**Gyurova, A.** Vladimirova, A., Peykov, S., Dimitrov, M., Strateva T.& Dimov, S.G. (2021) Characterization of *Enterococcus durans* EDD2, a strain from beehives with inhibitory activity against *Paenibacillus larvae*, Journal of Apicultural Research, doi: [10.1080/00218839.2021.1936915](https://doi.org/10.1080/00218839.2021.1936915)

Dimov, S.G, **Gyurova, A.**, Zagorchev, L., Dimitrov, T., Georgieva-Miteva, D., Peykov, S. NGS-Based Metagenomic Study of Four Traditional Bulgarian Green Cheeses from Tcherni Vit, LWT, Vol. 152, (2021), 112278, ISSN 0023-6438, doi: [10.1016/j.lwt.2021.112278](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112278)

Dimov, S.G., **Gyurova, A.**, Vladimirova, A., Dimitrov M., Peykov S., Strateva T., WGS-based characterization of the potentially beneficial *Enterococcus faecium* EFD from a beehive. *Mol Biol Rep* 47, 6445–6449 (2020). doi: [10.1007/s11033-020-05663-5](https://doi.org/10.1007/s11033-020-05663-5)

Peykov S., Vladimirova A., **Gyurova A.**, Dimitrov M., Strateva T., Dimov, S., Draft genome sequences of *Enterococcus durans* EDD2 strain associated with honeybees, *AIMS Agriculture and food*, Volume 5, Issue 2: 288-291 (2020). doi: [10.3934/agrfood.2020.2.288](https://doi.org/10.3934/agrfood.2020.2.288)

Dimov S. G., S. Peykov, A. Vladimirova, M. Balinska, **A. Gyurova**, M. Dimitrov, T. Strateva, Molecular genetic study of potentially bacteriocinogenic and non-virulent *Enterococcus* spp. isolates from beehives in Bulgaria, *Genetics and Plant Physiology*, 8(3–4): 129–137, (2018)

## БИБЛИОГРАФИЯ

1. Abdelfatah, E. N., & Mahboub, H. H. H. (2018). Studies on the effect of *Lactococcus garvieae* of dairy origin on both cheese and Nile tilapia (*O. niloticus*). *Int J Vet Sci Med*, 6(2), 201-207. doi:10.1016/j.ijvsm.2018.11.002
2. Afgan, E., Baker, D., Batut, B., van den Beek, M., Bouvier, D., Cech, M., . . . Blankenberg, D. (2018). The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic Acids Res*, 46(W1), W537-W544. doi:10.1093/nar/gky379
3. Al-Ghamdi, A., Al-Abbadi, A. A., Khan, K. A., Ghramh, H. A., Ahmed, A. M., & Ansari, M. J. (2020). In vitro antagonistic potential of gut bacteria isolated from indigenous honey bee race of Saudi Arabia against *Paenibacillus* larvae. *Journal of Apicultural Research*, 59(5), 825-833. doi:10.1080/00218839.2019.1706912
4. Al-Waili, N., Salom, K., Al-Ghamdi, A., & Ansari, M. J. (2012). Antibiotic, pesticide, and microbial contaminants of honey: human health hazards. *ScientificWorldJournal*, 2012, 930849. doi:10.1100/2012/930849
5. Alanagreh, L., Pegg, C., Harikumar, A., & Buchheim, M. (2017). Assessing intragenomic variation of the internal transcribed spacer two: Adapting the Illumina metagenomics protocol. *PLoS One*, 12(7), e0181491. doi:10.1371/journal.pone.0181491
6. Aldrete-Tapia, A., Escobar-Ramirez, C. M., Tamplin, M. L., & Hernandez-Iturriaga, M. (2018). Characterization of Bacterial Communities in Mexican Artisanal Raw Milk "Bola de Ocosingo" Cheese by High-Throughput Sequencing. *Front Microbiol*, 9, 2598. doi:10.3389/fmicb.2018.02598
7. Aldrete-Tapia, A., Escobar-Ramirez, M. C., Tamplin, M. L., & Hernandez-Iturriaga, M. (2014). High-throughput sequencing of microbial communities in Poro cheese, an artisanal Mexican cheese. *Food Microbiol*, 44, 136-141. doi:10.1016/j.fm.2014.05.022
8. Alonso-Salces, R. M., Cugnata, N. M., Guaspari, E., Pellegrini, M. C., Aubone, I., De Piano, F. G., . . . Fuselli, S. R. (2017). Natural strategies for the control of *Paenibacillus* larvae, the causative agent of American foulbrood in honey bees: a review. *Apidologie*, 48(3), 387-400. doi:10.1007/s13592-016-0483-1
9. Anast, J. M., Dzieciol, M., Schultz, D. L., Wagner, M., Mann, E., & Schmitz-Esser, S. (2019). *Brevibacterium* from Austrian hard cheese harbor a putative histamine catabolism pathway and a plasmid for adaptation to the cheese environment. *Sci Rep*, 9(1), 6164. doi:10.1038/s41598-019-42525-y
10. Audisio, M. C., & Benitez-Ahrendts, M. R. (2011). *Lactobacillus johnsonii* CRL1647, isolated from *Apis mellifera* L. bee-gut, exhibited a beneficial effect on honeybee colonies. *Benef Microbes*, 2(1), 29-34. doi:10.3920/BM2010.0024
11. Banwo, K., Sanni, A., & Tan, H. (2013). Technological properties and probiotic potential of *Enterococcus faecium* strains isolated from cow milk. *J Appl Microbiol*, 114(1), 229-241. doi:10.1111/jam.12031
12. Bartel, L. C., Abrahamovich, E., Mori, C., López, A. C., & Alippi, A. M. (2018). *Bacillus* and *Brevibacillus* strains as potential antagonists of *Paenibacillus* larvae and *Ascosphaera apis*. *Journal of Apicultural Research*, 58(1), 117-132. doi:10.1080/00218839.2018.1495439
13. Ben Braiek, O., & Smaoui, S. (2019). Enterococci: Between Emerging Pathogens and Potential Probiotics. *Biomed Res Int*, 2019, 5938210. doi:10.1155/2019/5938210
14. Birri, D. J., Brede, D. A., Tessema, G. T., & Nes, I. F. (2013). Bacteriocin production, antibiotic susceptibility and prevalence of haemolytic and gelatinase activity in faecal lactic acid bacteria isolated from healthy Ethiopian infants. *Microb Ecol*, 65(2), 504-516. doi:10.1007/s00248-012-0134-7
15. Biscola, V., Tolini, F. L., Choiset, Y., Rabesona, H., Ivanova, I., Chobert, J. M., . . . Franco, B. (2016). Proteolytic activity of *Enterococcus faecalis* VB63F for reduction of allergenicity of bovine milk proteins. *J Dairy Sci*, 99(7), 5144-5154. doi:10.3168/jds.2016-11036
16. Bockelmann, W., Koslowsky, M., Goerges, S., Scherer, S., Franz, C. M. A. P., & Heller, K. J. (2017). Growth inhibition of *Listeria monocytogenes* by bacteriocin-producing *Staphylococcus equorum* SE3 in cheese models. *Food Control*, 71, 50-56. doi:10.1016/j.foodcont.2016.06.019
17. Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120. doi:10.1093/bioinformatics/btu170
18. Butaye, P., Baele, M., Devriese, L. A., & Haesebrouck, F. (2002). Comparison of susceptibility to antimicrobials of the enterococcal species isolated from pigeons (*Columba livia*). *Microb Drug Resist*, 8(3), 215-218. doi:10.1089/107662902760326931
19. Carattoli, A., Zankari, E., Garcia-Fernandez, A., Voldby Larsen, M., Lund, O., Villa, L., . . . Hasman, H. (2014). In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother*, 58(7), 3895-3903. doi:10.1128/AAC.02412-14
20. Carina Audisio, M., Torres, M. J., Sabate, D. C., Ibarguren, C., & Apella, M. C. (2011). Properties of different lactic acid bacteria isolated from *Apis mellifera* L. bee-gut. *Microbiol Res*, 166(1), 1-13. doi:10.1016/j.micres.2010.01.003

21. Caron, T., Piver, M. L., Péron, A.-C., Lieben, P., Lavigne, R., Brunel, S., . . . Chassard, C. (2020). Strong effect of *Penicillium roqueforti* populations on volatile and metabolic compounds responsible for aromas, flavour and texture in blue cheeses. *hal-02990776*. doi:10.1101/2020.03.02.974352
22. Carota, E., Crognale, S., D'Annibale, A., Gallo, A. M., Stazi, S. R., & Petruccioli, M. (2017). A sustainable use of Ricotta Cheese Whey for microbial biodiesel production. *Sci Total Environ*, 584-585, 554-560. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.01.068
23. Centeno, J. A., Garabal, J. I., Docampo, F., Lorenzo, J. M., & Carballo, J. (2017). Recovering traditional raw-milk Tetilla cheese flavour and sensory attributes by using *Kocuria varians* and *Yarrowia lipolytica* adjunct cultures. *Int J Food Microbiol*, 251, 33-40. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.03.014
24. Ceugniz, A., Taminiau, B., Coucheney, F., Jacques, P., Delcenserie, V., Daube, G., & Drider, D. (2017). Use of a metagenetic approach to monitor the bacterial microbiota of "Tomme d'Orchies" cheese during the ripening process. *Int J Food Microbiol*, 247, 65-69. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.034
25. Chao, A., Lee, C.-M., & Chen, T.-C. (1988). A generalized Good's nonparametric coverage estimator. *Chinese Journal of Mathematics*, 16(3).
26. Cintas, L. M., Casaus, L., Nes, I. F., Havarstein, L. S., Holo, H., & Hernandez, P. (1998). Enterocins L50A and L50B, Two Novel Bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, Are Related to Staphylococcal Hemolysins. *Journal of Bacteriology*, 180(8), 1988-1994.
27. Cintas, L. M., Casaus, P., Havarstein, L. S., Hernandez, P. E., & Nes, I. F. (1997). Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl Environ Microbiol*, 63(11), 4321-4330.
28. Cintas, L. M., Casaus, P., Holo, H., Hernandez, P. E., Nes, I. F., & Havarstein, L. S. (1998). Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *J Bacteriol*, 180(8), 1988-1994.
29. Claesson, M. J., Wang, Q., O'Sullivan, O., Greene-Diniz, R., Cole, J. R., Ross, R. P., & O'Toole, P. W. (2010). Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. *Nucleic Acids Research*, 38(22), e200-e200. doi:10.1093/nar/gkq873
30. Clausen, P., Aarestrup, F. M., & Lund, O. (2018). Rapid and precise alignment of raw reads against redundant databases with KMA. *BMC Bioinformatics*, 19(1), 307. doi:10.1186/s12859-018-2336-6
31. Cocolin, L., Foschino, R., Comi, G., & Grazia Fortina, M. (2007). Description of the bacteriocins produced by two strains of *Enterococcus faecium* isolated from Italian goat milk. *Food Microbiol*, 24(7-8), 752-758. doi:10.1016/j.fm.2007.03.001
32. Dal Bello, B., Rantsiou, K., Bellio, A., Zeppa, G., Ambrosoli, R., Civera, T., & Cocolin, L. (2010). Microbial ecology of artisanal products from North West of Italy and antimicrobial activity of the autochthonous populations. *LWT - Food Science and Technology*, 43, 1151-1159. doi:10.1016/j.lwt.2010.03.008
33. Dalmasso, A., Soto del Rio, M. d. I. D., Civera, T., Pattono, D., Cardazzo, B., & Bottero, M. T. (2016). Characterization of microbiota in Plaisentif cheese by high-throughput sequencing. *LWT - Food Science and Technology*, 69, 490-496. doi:10.1016/j.lwt.2016.02.004
34. Dan, T., Ren, W., Liu, Y., Tian, J., Chen, H., Li, T., & Liu, W. (2019). Volatile Flavor Compounds Profile and Fermentation Characteristics of Milk Fermented by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Front Microbiol*, 10, 2183. doi:10.3389/fmicb.2019.02183
35. Darling, A. C., Mau, B., Blattner, F. R., & Perna, N. T. (2004). Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Res*, 14(7), 1394-1403. doi:10.1101/gr.2289704
36. de Jong, A., van Heel, A. J., Kok, J., & Kuipers, O. P. (2010). BAGEL2: mining for bacteriocins in genomic data. *Nucleic Acids Res*, 38(Web Server issue), W647-651. doi:10.1093/nar/gkq365
37. De Vuyst, L. (2003). Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. *International Journal of Food Microbiology*, 84(3), 299-318. doi:10.1016/s0168-1605(02)00425-7
38. Delcenserie, V., Taminiau, B., Delhalle, L., Nezer, C., Doyen, P., Crevecoeur, S., . . . Daube, G. (2014). Microbiota characterization of a Belgian protected designation of origin cheese, Herve cheese, using metagenomic analysis. *J Dairy Sci*, 97(10), 6046-6056. doi:10.3168/jds.2014-8225
39. Dimov, S., Strateva, T., Petkova, V., Dimitrova, M., & Atanasova, D. (2015). Phylogenetic relatedness clustering thresholds of potentially bacteriocinogenic clinical and dairy *Enterococcus* spp. strains with respect to their geographical origins in Bulgaria. *J Microbiol Biotech Food Sci*, 5, 286-289. doi:10.15414/jmbfs.2015/16.5.3.286-289
40. Dimov, S. G. (2007). A novel bacteriocin-like substance produced by *Enterococcus faecium* 3587. *Curr Microbiol*, 55(4), 323-327. doi:10.1007/s00284-007-0018-0
41. Dimov, S. G., Peykov, S., Raykova, D., Ivanova, P., Kirilov, N., Dalgalarrodo, M., . . . Ivanova, I. (2010). A newly discovered bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* 3915. *Benef Microbes*, 1(1), 43-51. doi:10.3920/BM2008.1004

42. Dugat-Bony, E., Garnier, L., Denonfoux, J., Ferreira, S., Sarthou, A. S., Bonnarme, P., & Irlinger, F. (2016). Highlighting the microbial diversity of 12 French cheese varieties. *Int J Food Microbiol*, 238, 265-273. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.09.026
43. Dumas, E., Feurtey, A., Rodriguez de la Vega, R. C., Le Prieur, S., Snirc, A., Coton, M., . . . Giraud, T. (2020). Independent domestication events in the blue-cheese fungus *Penicillium roqueforti*. *Mol Ecol*, 29(14), 2639-2660. doi:10.1111/mec.15359
44. Escobar-Zepeda, A., Sanchez-Flores, A., & Quirasco Baruch, M. (2016). Metagenomic analysis of a Mexican ripened cheese reveals a unique complex microbiota. *Food Microbiol*, 57, 116-127. doi:10.1016/j.fm.2016.02.004
45. Facklam, R., & Moody, M. (1970). Presumptive Identification of Group D Streptococci: the Bile-Esculin Test. *Applied Microbiology*, 20(2), 245-250.
46. Faith, D. (1992). Conservation evaluation and phylogenetic diversity. *Biological Conservation*, 61, 1-10.
47. Fernández, E., Alegría, Á., Delgado, S., & Mayo, B. (2010). Phenotypic, genetic and technological characterization of *Lactococcus garvieae* strains isolated from a raw milk cheese. *International Dairy Journal*, 20(3), 142-148. doi:10.1016/j.idairyj.2009.11.004
48. Fleischmann, R., Adams, M., White, O., Clayton, R., Fraser, C., Smith, H., & Ventert, J. (1995). Whole-Genome Random Sequencing and Assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*, 269, 496-512.
49. Fortina, M. G., Ricci, G., Foschino, R., Picozzi, C., Dolci, P., Zeppa, G., . . . Manachini, P. L. (2007). Phenotypic typing, technological properties and safety aspects of *Lactococcus garvieae* strains from dairy environments. *J Appl Microbiol*, 103(2), 445-453. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03265.x
50. Garcia-Estrada, C., & Martin, J. F. (2016). Biosynthetic gene clusters for relevant secondary metabolites produced by *Penicillium roqueforti* in blue cheeses. *Appl Microbiol Biotechnol*, 100(19), 8303-8313. doi:10.1007/s00253-016-7788-x
51. Gori, K., Ryssel, M., Arneborg, N., & Jespersen, L. (2013). Isolation and identification of the microbiota of Danish farmhouse and industrially produced surface-ripened cheeses. *Microb Ecol*, 65(3), 602-615. doi:10.1007/s00248-012-0138-3
52. Graham, K., Stack, H., & Rea, R. (2020). Safety, beneficial and technological properties of enterococci for use in functional food applications - a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 1-26. doi:10.1080/10408398.2019.1709800
53. Grundmann, H., Maher, M., Towner, K., Seifert, H., Dijkshoorn, L., Gerner-Smidt, P., & Vaneechoutte, M. (1997). Multicenter Study Using Standardized Protocols and Reagents for Evaluation of Reproducibility of PCR-Based Fingerprinting of *Acinetobacter* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(12), 3071-3077.
54. Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., & Tesler, G. (2013). QAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, 29(8), 1072-1075. doi:10.1093/bioinformatics/btt086
55. Hollenbeck, B. L., & Rice, L. B. (2012). Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. *Virulence*, 3(5), 421-433. doi:10.4161/viru.21282
56. Ianni, A., Di Domenico, M., Bennato, F., Peserico, A., Martino, C., Rinaldi, A., . . . Martino, G. (2020). Metagenomic and volatile profiles of ripened cheese obtained from dairy ewes fed a dietary hemp seed supplementation. *Journal of Dairy Science*, 103(7), 5882-5892. doi:10.3168/jds.2019-17954
57. Imran, M., Desmaures, N., Coton, M., Coton, E., Le Fleche-Mateos, A., Irlinger, F., . . . Vernoux, J. P. (2019). Safety assessment of Gram-negative bacteria associated with traditional French cheeses. *Food Microbiol*, 79, 1-10. doi:10.1016/j.fm.2018.11.001
58. Iorizzo, M., Letizia, F., Ganassi, S., Testa, B., Petrarca, S., Albanese, G., . . . De Cristofaro, A. (2022). Functional Properties and Antimicrobial Activity from Lactic Acid Bacteria as Resources to Improve the Health and Welfare of Honey Bees. *Insects*, 13(3). doi:10.3390/insects13030308
59. Janashia, I., Carminati, D., Rossetti, L., Zago, M., Fornasari, M. E., Haertlé, T., . . . Giraffa, G. (2016). Characterization of fructophilic lactic microbiota of *Apis mellifera* from the Caucasus Mountains. *Annals of Microbiology*, 66(4), 1387-1395. doi:10.1007/s13213-016-1226-2
60. Janashia, I., Choiset, Y., Rabesona, H., Hwanhlem, N., Bakuradze, N., Chanishvili, N., & Haertlé, T. (2016). Protection of honeybee *Apis mellifera* by its endogenous and exogenous lactic flora against bacterial infections. *Annals of Agrarian Science*, 14(3), 177-181. doi:10.1016/j.aasci.2016.07.002
61. Jaouani, I., Abbassi, M. S., Alessandria, V., Bouraoui, J., Ben Salem, R., Kilani, H., . . . Cocolin, L. (2014). High inhibition of *Paenibacillus* larvae and *Listeria monocytogenes* by *Enterococcus* isolated from different sources in Tunisia and identification of their bacteriocin genes. *Lett Appl Microbiol*, 59(1), 17-25. doi:10.1111/lam.12239
62. Jeong, D. W., Heo, S., Ryu, S., Blom, J., & Lee, J. H. (2017). Genomic insights into the virulence and salt tolerance of *Staphylococcus equorum*. *Sci Rep*, 7(1), 5383. doi:10.1038/s41598-017-05918-5

63. Kim, B. R., Shin, J., Guevarra, R., Lee, J. H., Kim, D. W., Seol, K. H., . . . Isaacson, R. (2017). Deciphering Diversity Indices for a Better Understanding of Microbial Communities. *J Microbiol Biotechnol*, 27(12), 2089-2093. doi:10.4014/jmb.1709.09027
64. Kirschner, C., Maquelin, K., Pina, P., Ngo Thi, N. A., Choo-Smith, L. P., Sockalingum, G. D., . . . Naumann, D. (2001). Classification and identification of enterococci: a comparative phenotypic, genotypic, and vibrational spectroscopic study. *J Clin Microbiol*, 39(5), 1763-1770. doi:10.1128/JCM.39.5.1763-1770.2001
65. Klaenhammer, T. R., Altermann, E., Arigoni, F., Bolotin, A., & Breidt, F. (2002). Discovering lactic acid bacteria by genomics. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82, 29-58.
66. Klibi, N., Ben Slimen, N., Fhoula, I., López, M., Ben Slama, K., Daffonchio, D., . . . Ouzari, H. (2012). Genotypic diversity, antibiotic resistance and bacteriocin production of enterococci isolated from rhizospheres. *Microbes Environ*, 27(4), 533-537. doi:10.1264/jsme2.me12041
67. Kurekci, C. (2016). Short communication: Prevalence, antimicrobial resistance, and resistant traits of coagulase-negative staphylococci isolated from cheese samples in Turkey. *J Dairy Sci*, 99(4), 2675-2679. doi:10.3168/jds.2015-10725
68. Liu, F., Li, B., Du, J., Yu, S., Li, W., Evivie, S. E., . . . Huo, G. (2016). Complete genome sequence of *Enterococcus durans* KLDS6.0930, a strain with probiotic properties. *J Biotechnol*, 217, 49-50. doi:10.1016/j.jbiotec.2015.11.012
69. Lukjancenko, O., Ussery, D. W., & Wassenaar, T. M. (2012). Comparative genomics of *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* and related probiotic genera. *Microb Ecol*, 63(3), 651-673. doi:10.1007/s00248-011-9948-y
70. Lusk, T. S., Ottesen, A. R., White, J. R., Allard, M. W., Brown, E. W., & Kase, J. A. (2012). Characterization of microflora in Latin-style cheeses by next-generation sequencing technology. *BMC Microbiol*, 12, 254. doi:10.1186/1471-2180-12-254
71. Marino, M., Dubsy de Wittenau, G., Sacca, E., Cattonaro, F., Spadotto, A., Innocente, N., . . . Marroni, F. (2019). Metagenomic profiles of different types of Italian high-moisture Mozzarella cheese. *Food Microbiol*, 79, 123-131. doi:10.1016/j.fm.2018.12.007
72. Mazorra-Manzano, M. A., Robles-Porchas, G. R., Martínez-Porchas, M., Ramírez-Suárez, J. C., García-Sifuentes, C. O., Torres-Llanez, M. J., . . . Vallejo-Cordoba, B. (2022). Bacterial Diversity and Dynamics during Spontaneous Cheese Whey Fermentation at Different Temperatures. *Fermentation*, 8(7). doi:10.3390/fermentation8070342
73. McFrederick, Q. S., Wcislo, W. T., Taylor, D. R., Ishak, H. D., Dowd, S. E., & Mueller, U. G. (2012). Environment or kin: whence do bees obtain acidophilic bacteria? *Mol Ecol*, 21(7), 1754-1768. doi:10.1111/j.1365-294X.2012.05496.x
74. Minnaard, J., & Alippi, A. M. (2016). Partial characterization of bacteriocin-like compounds from two strains of *Bacillus cereus* with biological activity against *Paenibacillus* larvae, the causal agent of American Foulbrood disease. *Lett Appl Microbiol*, 63(6), 442-449. doi:10.1111/lam.12665
75. Mohammad, S. M., Mahmud-Ab-Rashid, N. K., & Zawawi, N. (2021). Stingless Bee-Collected Pollen (Bee Bread): Chemical and Microbiology Properties and Health Benefits. *Molecules*, 26(4). doi:10.3390/molecules26040957
76. Moharram, A. M., A. Abd El Haleem, A., & R. S. Refaie, R. (2018). Mycological and Mycotoxins Analysis of Kareish and Soft Cheese in Assiut, Egypt. *American Journal of Microbiological Research*, 6(4), 165-172. doi:10.12691/ajmr-6-4-4
77. Mounier, J., Coton, M., Irlinger, F., Landaud, S., & Bonnarme, P. (2017). Chapter 38 - Smear-Ripened Cheeses. In P. L. H. McSweeney, P. F. Fox, P. D. Cotter, & D. W. Everett (Eds.), *Cheese (Fourth Edition)* (pp. 955-996). San Diego: Academic Press.
78. Nunez, M. (1978). Microflora of Cabrales cheese: changes during maturation. *Journal of Dairy Research*, 45, 501-508.
79. Nunez, M., Medina, M., Gaya, P., & Dias-Amado, C. (1981). Les levures et les moisissures dans le fromage bleu de Cabrales. *Le Lait*, 61, 62-79.
80. Olofsson, T. C., & Vasquez, A. (2008). Detection and identification of a novel lactic acid bacterial flora within the honey stomach of the honeybee *Apis mellifera*. *Curr Microbiol*, 57(4), 356-363. doi:10.1007/s00284-008-9202-0
81. Ozdemir, G. B., Oryaşın, E., Bıyık, H. H., Ozteber, M., & Bozdoğan, B. (2011). Phenotypic and genotypic characterization of bacteriocins in enterococcal isolates of different sources. *Indian journal of microbiology*, 51(2), 182-187. doi:10.1007/s12088-011-0143-0
82. Papademas, P., Aspri, M., Mariou, M., Dowd, S. E., Kazou, M., & Tsakalidou, E. (2019). Conventional and omics approaches shed light on Halitzia cheese, a long-forgotten white-brined cheese from Cyprus. *International Dairy Journal*, 98, 72-83. doi:10.1016/j.idairyj.2019.06.010

83. Pinto, A. L., Fernandes, M., Pinto, C., Albano, H., Castilho, F., Teixeira, P., & Gibbs, P. A. (2009). Characterization of anti-*Listeria* bacteriocins isolated from shellfish: potential antimicrobials to control non-fermented seafood. *Int J Food Microbiol*, *129*(1), 50-58. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.11.005
84. Poeta, P., Costa, D., Rojo-Bezares, B., Zarazaga, M., Klibi, N., Rodrigues, J., & Torres, C. (2007). Detection of antimicrobial activities and bacteriocin structural genes in faecal enterococci of wild animals. *Microbiol Res*, *162*(3), 257-263. doi:10.1016/j.micres.2006.06.003
85. Quijada, N. M., Mann, E., Wagner, M., Rodriguez-Lazaro, D., Hernandez, M., & Schmitz-Esser, S. (2018). Autochthonous facility-specific microbiota dominates washed-rind Austrian hard cheese surfaces and its production environment. *Int J Food Microbiol*, *267*, 54-61. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.12.025
86. Ramos, O. Y., Basualdo, M., Libonatti, C., & Vega, M. F. (2020). Current status and application of lactic acid bacteria in animal production systems with a focus on bacteria from honey bee colonies. *J Appl Microbiol*, *128*(5), 1248-1260. doi:10.1111/jam.14469
87. Rivas, F. P., Castro, M. P., Vallejo, M., Marguet, E., & Campos, C. A. (2012). Antibacterial potential of *Enterococcus faecium* strains isolated from ewes' milk and cheese. *LWT - Food Science and Technology*, *46*(2), 428-436. doi:10.1016/j.lwt.2011.12.005
88. Rodriguez, R. L., Gunturu, S., Harvey, W. T., Rossello-Mora, R., Tiedje, J. M., Cole, J. R., & Konstantinidis, K. T. (2018). The Microbial Genomes Atlas (MiGA) webserver: taxonomic and gene diversity analysis of Archaea and Bacteria at the whole genome level. *Nucleic Acids Res*, *46*(W1), W282-W288. doi:10.1093/nar/gky467
89. Ropars, J., Cruaud, C., Lacoste, S., & Dupont, J. (2012). A taxonomic and ecological overview of cheese fungi. *Int J Food Microbiol*, *155*(3), 199-210. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.02.005
90. Sabia, C., Messi, P., de Niederhausern, S., Manicardi, G., & Bondi, M. (2004). Study of two bacteriocins produced by *Enterococcus casseliflavus* and *Ent. faecalis*. *Lett Appl Microbiol*, *38*(2), 99-105. doi:10.1111/j.1472-765x.2003.01459.x
91. Salazar, J. K., Carstens, C. K., Ramachandran, P., Shazer, A. G., Narula, S. S., Reed, E., . . . Schill, K. M. (2018). Metagenomics of pasteurized and unpasteurized gouda cheese using targeted 16S rDNA sequencing. *BMC Microbiol*, *18*(1), 189. doi:10.1186/s12866-018-1323-4
92. Saridaki-Papakonstadinou, M., Andredakis, S., Burriel, A., & Tsachev, I. (2006). Determination of Tetracycline Residues in Greek Honey. *Trakia Journal of Sciences*, *4*(1), 33-36.
93. Schön, K., Schornsteiner, E., Dzieciol, M., Wagner, M., Müller, M., & Schmitz-Esser, S. (2016). Microbial communities in dairy processing environment floor-drains are dominated by product-associated bacteria and yeasts. *Food Control*, *70*, 210-215. doi:10.1016/j.foodcont.2016.05.057
94. Tatusova, T., DiCuccio, M., Badretdin, A., Chetvernin, V., Nawrocki, E. P., Zaslavsky, L., . . . Ostell, J. (2016). NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Res*, *44*(14), 6614-6624. doi:10.1093/nar/gkw569
95. Tilocca, B., Costanzo, N., Morittu, V. M., Spina, A. A., Soggiu, A., Britti, D., . . . Piras, C. (2020). Milk microbiota: Characterization methods and role in cheese production. *J Proteomics*, *210*, 103534. doi:10.1016/j.jprot.2019.103534
96. Tittarelli, F., Perpetuini, G., Di Gianvito, P., & Tofalo, R. (2019). Biogenic amines producing and degrading bacteria: A snapshot from raw ewes' cheese. *Lwt*, *101*, 1-9. doi:10.1016/j.lwt.2018.11.030
97. Tsapekos, P., Alvarado-Morales, M., Baladi, S., Bosma, E. F., & Angelidaki, I. (2020). Fermentative Production of Lactic Acid as a Sustainable Approach to Valorize Household Bio-Waste. *Frontiers in Sustainability*, *1*. doi:10.3389/frsus.2020.00004
98. Unno, R., Suzuki, T., Matsutani, M., & Ishikawa, M. (2021). Evaluation of the Relationships Between Microbiota and Metabolites in Soft-Type Ripened Cheese Using an Integrated Omics Approach. *Front Microbiol*, *12*, 681185. doi:10.3389/fmicb.2021.681185
99. van Heel, A. J., de Jong, A., Song, C., Viel, J. H., Kok, J., & Kuipers, O. P. (2018). BAGEL4: a user-friendly web server to thoroughly mine RiPPs and bacteriocins. *Nucleic Acids Res*, *46*(W1), W278-W281. doi:10.1093/nar/gky383
100. Vásquez, A., Olofsson, T. C., & Sammataro, D. (2008). A scientific note on the lactic acid bacterial flora in honeybees in the USA – A comparison with bees from Sweden. *Apidologie*, *40*(1), 26-28. doi:10.1051/apido:2008063
101. Vermote, L., Verce, M., De Vuyst, L., & Weckx, S. (2018). Amplicon and shotgun metagenomic sequencing indicates that microbial ecosystems present in cheese brines reflect environmental inoculation during the cheese production process. *International Dairy Journal*, *87*, 44-53. doi:10.1016/j.idairyj.2018.07.010
102. Vignaroli, C., Zandri, G., Aquilanti, L., Pasquaroli, S., & Biavasco, F. (2011). Multidrug-resistant enterococci in animal meat and faeces and co-transfer of resistance from an *Enterococcus durans* to a human *Enterococcus faecium*. *Curr Microbiol*, *62*(5), 1438-1447. doi:10.1007/s00284-011-9880-x

103. Walther, G., Pawlowska, J., Alastruey-Izquierdo, A., Wrzosek, M., Rodriguez-Tudela, J. L., Dolatabadi, S., . . . de Hoog, G. S. (2013). DNA barcoding in Mucorales: an inventory of biodiversity. *Persoonia*, *30*, 11-47. doi:10.3767/003158513X665070
104. Webster, C., Townert, K., Humphreys, H., Ehrenstein, B., Hartung, D., & Grundmann, H. (1996). Comparison of rapid automated laser fluorescence analysis of DNA fingerprints with four other computer-assisted approaches for studying relationships between *Acinetobacter baumannii* isolates. *J. Med Microbiol*, *44*, 185-194.
105. Yoshiyama, M., & Kimura, K. (2009). Bacteria in the gut of Japanese honeybee, *Apis cerana japonica*, and their antagonistic effect against *Paenibacillus* larvae, the causal agent of American foulbrood. *J Invertebr Pathol*, *102*(2), 91-96. doi:10.1016/j.jip.2009.07.005
106. Yoshiyama, M., Wu, M., Sugimura, Y., Takaya, N., Kimoto-Nira, H., & Suzuki, C. (2013). Inhibition of *Paenibacillus* larvae by lactic acid bacteria isolated from fermented materials. *J Invertebr Pathol*, *112*(1), 62-67. doi:10.1016/j.jip.2012.09.002
107. Zamberi, N. R., Mohamad, N. E., Yeap, S. K., Ky, H., Beh, B. K., Liew, W. C., . . . Alitheen, N. B. (2016). 16S Metagenomic Microbial Composition Analysis of Kefir Grain using MEGAN and BaseSpace. *Food Biotechnology*, *30*(3), 219-230. doi:10.1080/08905436.2016.1200987
108. Zhang, W., Luo, Q., Zhu, Y., Ma, J., Cao, L., Yang, M., . . . He, X. (2018). Microbial diversity in two traditional bacterial douchi from Gansu province in northwest China using Illumina sequencing. *PLoS One*, *13*(3), e0194876. doi:10.1371/journal.pone.0194876