

СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ „СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ“
БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА „ОБЩА И ПРОМИШЛЕНА МИКРОБИОЛОГИЯ“



Мария Илиева Пандова

Ентерококите - на границата на полезното и вредното

АВТОРЕФЕРАТ

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

Научен ръководител: проф. г-р Петя Христова

СОФИЯ
2025г.

Докторантката Мария Пандова е разработила дисертация за присъждане на образователна и научна степен „доктор“ като редовен докторант в професионално направление 4.4. Биологични науки – „Микробиология“ при Биологически факултет на Софийския университет „Св. Климент Охридски“.

Дисертационният труд е обсъден на разширено заседание на катедрата по Обща и промишлена микробиология към Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски“, проведено на 18.06.2025 г. и насрочен за защита пред научно жури, сформирано със заповед..... на Ректора на Софийски университет „Св. Климент Охридски“.

Вътрешни членове на научното жури:

1.
2.

Външни членове на научното жури:

3.
4.
5.

Публичната защита на дисертацията ще се състои на г. от ч. в сградата на Биологически факултет на Софийския университет „Св. Климент Охридски“. Материалите за защитата на дисертацията са достъпни за заинтересованите лица в Катедра по обща и промишлена микробиология, както и на интернет страницата на университета. Дисертацията съдържа 198 страници на формат А4, 5 приложения, 39 фигури и 16 таблици. Библиографията включва 500 цитирани литературни източника. Експерименталната работа е извършена в лабораториите на Катедра по обща и промишлена микробиология при Софийския университет „Св. Климент Охридски“.

Използвани съкращения

AMP (Ampicillin) - Ампицилин	COVID-19 (COronaVirus Disease of 2019) - Коронавирусната болест от 2019 г.	GRAS (Generally Recognized as Safe) – Общо приети за безопасни
AOI (area of interest) – област на интерес	CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) -	HLGR (High Level Gentamicin Resistance) - резистентост към високи концентрации на гентамицин
AS (aggregation substance) – агрегационно вещество	crPHK – CRISPR рибонуклеинова киселина	HLSR (High-Level Streptomycin Resistance) - резистентост към високи концентрации на стрептомицин
ATCC (American Type Culture Collection) – Американска колекция за микроорганизми	EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) -	HPLS (High Performance Liquid Chromatography) - Високоэффективна течна хроматография
AU (arbitrary units) – арбитражни единици	Етилендиаминтетраоцетната киселина	IS (insertion sequence) – инсерционна секвенция
BHI (Brain Heart Infusion) - Мозъчна сърдечна инфузия	EFSA (European Food Safety Authority) - Европейска агенция по безопасност на храните	ISO (International Organization for Standardization) - Международна организация по стандартизация
bp (base pairs) – базови двойки	ERV (Eravacycline) - Еравациклин	MALDI-TOF (Matrix- assisted Laser Desorption/Ionization Time- of-flight) - Матрично- асистирана лазерна десорбция/йонизация време на полета
CARD (Comprehensive Antibiotic Resistance Database) - Пълна база данни за антибиотична резистентност	EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) - Европейски комитет за тестване на антимикробна чувствителност	
CDS (coding DNA sequence) – кодираща ДНК секвенция	FAO (Food and Agricultural Organization) - Организация на храните и селското стопанство	
CFU (Colony-forming units) – колония-образуващи единици		
CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) - Институт за клинични и лабораторни стандарти		

MB (megabase) - мегабази

MGE (mobile genetic element) – мобилен генетичен елемент

MLST (Multilocus sequence typing) – Мултилокусно секвенционно типирание

MRS (De Man – Rogosa – Sharpe) - Де Ман – Рогоза – Шарп

MSCRAMMs (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules) – Микробни повърхностни компоненти разпознаващи адхезивни матриксни молекули

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

NCBI (National Center for Biotechnology Information) – Национален център за биотехнологична информация - САЩ

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

PCR (Polymerase Chain Reaction) – Полимеразна верижна реакция

QPS (Qualified presumption of safety) - Квалифицирана презумпция за безопасност

rSAM (radical S-adenosylmethionine) – S-аденозилметионин радикал

SARS-coV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) - тежък остър респираторен синдром коронавирус 2

SDS (Sodium dodecyl sulfate) - Натриев додецилсулфат

TCN (Tetracycline) - Тетрациклин

TG (Tigecycline) - Тигециклин

TSA (Tryptic Soy Agar) – Триптон соев агар

TYGS (Type (Strain) Genome Server) - Тип (щам) геномен сървър

WHO (World Health Organization) - Световна здравна организация

ГИТ – гастроинтестинален тракт

ДНК – Дезоксирибонуклеинова киселина

МСЕ - минималната свободна енергия

рДНК – рибозомална дезоксирибонуклеинова киселина

РНК – Рибонуклеинова киселина

рРНК – рибозомална рибонуклеинова киселина

ХГТ – хоризонтален генен трансфер

Съдържание

Използвани съкращения.....	3
Въведение	9
Цел и задачи	11
Материали и методи.....	12
Материали	12
1. Микроорганизми	12
2. Хранителни среди	13
3. Използвани антибиотични дискове	15
Методи	17
1. Пробовземане, изолиране на бактериални култури и тяхното съхранение	17
2. Изолиране на ДНК от бактериалните култури.....	17
3. Подходи за видова идентификация на изолатите.....	18
4. Анализирание на разпространението на CRISPR локусите и CRISPR-асоциираните белтъци чрез PCR	19
5. Детекция на мобилни генетични елементи чрез PCR	19
6. Детекция на гени за вирулентност чрез PCR.....	20
7. Желатиназна активност	20
8. Цитолитична активност	21
9. ДНК-азна активност	21
10. Определяне на фенотипна чувствителност/резистентност на ентерококите към различни групи антибиотици	21
11. Детекция на гени за антибиотична резистентност чрез PCR	22

12. Целогеномно секвениране и биоинформатична обработка на секвенциите.	23
13. Статистически анализи.....	24
14. Антибактериална активност на ентерококите при ко-култивиране с тест микроорганизми	24
15. Определяне на антибактериалната активност на безклетъчните супернатанти.....	25
16. Определяне на устойчивостта на антибактериалните вещества към температура, сърфактанти и третиране с ензими	26
17. Определяне динамиката на биосинтеза на антибактериално вещество	27
Резултати	28
I. Изолране и видова идентификация на ентерококовата колекция.....	28
II. Целогеномно секвениране на избрани щамове и биоинформатична обработка	37
III. Характеристики на ентерококите, асоциирани с потенциал за причиняване на заболявания	42
1. Скрининг за гени, асоциирани с ентерококовата вирулентност	42
2. Наличие на <i>суlB</i> гена и продукция на хемолизин	46
3. Наличие на <i>gelE</i> ген, <i>fsr</i> оперон и продукция на желатиназа	48
4. Наличие на <i>pic1</i> ген и експресия на нуклеазна активност	50
5. Фенотипна антибиотична резистентност	52
6. Скрининг за гени за антибиотична резистентност	56
IV. Генетични детерминанти, участващи в хоризонталния генен трансфер (ХГТ)	64
1. Агрегационни вещества	64
2. Полови феромони	66

3. Мобилни генетични елементи	67
V. CRISPR-локуси и CRISPR-асоциирани белтъци (CAS белтъци).	68
VI. Характеристики на ентерококите с потенциал за приложение в пробиотични продукти	77
1. Антагонизъм на ентерококите към патогенни микроорганизми	77
2. Оценка на безопасността на щам <i>E.mundtii</i> CA8 и CA17 за употребата им като пробиотици	90
Изводи	92
Приноси	93
I. Приноси с фундаментален характер	93
II. Приноси с приложен характер	93
Приложение 1: Геномна карта на щам <i>E. faecalis</i> CM4, една хромозома и три плазмида. Червен цвят- гени за антибиотична резистентност, син цвят- CRISPR системи. Изображението е генерирано чрез Map Builder в Proksee софтуера, Версия 2.0.5. (https://proksee.ca/).....	94
Приложение 2: Геномна карта на щам <i>E. faecalis</i> BM5, една хромозома и два плазмида. Червен цвят- гени за антибиотична резистентност, син цвят- CRISPR системи. Изображението е генерирано чрез Map Builder в Proksee софтуера, Версия 2.0.5. (https://proksee.ca/).....	95
Приложение 3: Геномна карта на щам <i>E. faecalis</i> BM12, една хромозома и два плазмида. Червен цвят- гени за антибиотична резистентност, син цвят- CRISPR системи. Изображението е генерирано чрез Map Builder в Proksee софтуера, Версия 2.0.5. (https://proksee.ca/).....	96
Приложение 4: Геномна карта на щам <i>E. faecalis</i> BM15, една хромозома и два плазмида. Червен цвят- гени за антибиотична резистентност, жълт цвят- CRISPR системи.	

Изображението е генерирано чрез Map Builder в Proksee софтуера, Версия 2.0.5. (<https://proksee.ca/>)..... 97

Приложение 5: Геномни карти на щамове *E. mundtii* CA8 и *E. mundtii* CA17. В щамовете са асемблирани единствено пълните кръгови хромозоми . Червен цвят- гени за антибиотична резистентност, син цвят- CRISPR системи. Изображението е генерирано чрез Map Builder в Proksee софтуера, Версия 2.0.5. (<https://proksee.ca/>).. 98

Публикации, свързани с дисертационния труд 99

Участие в научни форуми 100

Участие в научни проекти 102

Въведение

От древността, повсеместните млечнокиселини бактерии ентерококи, които са преобладаващи както в чревната флора на хората, така и в животните, са били използвани (и все още са) като пробиотици в производството на храни и фуражи. Техните качества обаче срещат няколко препятствия, особено по отношение на набора от детерминанти на вирулентност, които почти предотвратяват използването им като пробиотици. Освен това, представители на рода *Enterococcus* показват присъща резистентност към редица антимикробни агенти и изключителна гъвкавост за придобиване на детерминанти на резистентност, кодирани върху широк спектър от конюгиращи плазмиди, транспозони и бактериофаги. Наличието на такива патогенни аспекти сред някои видове представлява критична бариера, компрометираща използването им като пробиотици в храните.

По този начин, родът нито има статут на общопризнат като безопасен (GRAS), нито е включен в списъка с квалифицирана презумпция за безопасност (QPS), което предполага драстично законодателство спрямо тези микроорганизми.

Към днешна дата познанията за факторите на вирулентност и генетичната структура на хранителните ентерококови щамове са доста ограничени. Въпреки че никога не са били докладвани ентерококови инфекции, произхождащи от консумацията на храна, съдържаща вирулентни ентерококи, тези хабитати изглежда са рисков път за предаването на гени за антибиотична резистентност и вирулентност. Благоприятно е, че факторите на вирулентност на ентерококите изглеждат щамово специфични, което предполага, че клиничните изолати носят много повече детерминанти от хранителните изолати. Последните остават широко чувствителни към клинично значими антибиотици и следователно имат по-нисък потенциал за патогенност. По отношение на идеалния кандидат за ентерококи, избраните щамове, предназначени за употреба в храни, не трябва да притежават никакви гени за вирулентност и трябва да са чувствителни към клинично значими антибиотици. Като цяло, прилагането на подходящ анализ на риска/полза, в допълнение към оценката за всеки отделен случай, установяването на безвредността на щама и разглеждането на съответните насоки, законодателство и регулаторни аспекти, свързани с разработването на функционални храни, изглежда са ключовите елементи за индустриите, здравния персонал и потребителите, за да

приемат ентерококите, подобно на други млечнокисели бактерии, като важни кандидати за полезни и благоприятни приложения в хранителната промишленост и хранителната биотехнология. Настоящата дисертация има за цел да хвърли светлина върху двойствената природа на представителите на род *Enterococcus* и да изясни както положителните им свойства, така и ограниченията, които възпрепятстват тяхното предлагане като пробиотици. Обсъжда се и бъдещето на употребата на ентерококи като пробиотици, както и законодателството в тази област.

Цел и задачи

Целта на настоящата дисертация е детайлна характеристика на видове от род *Enterococcus* с оглед установяване на биологичните им свойства, разкриващи тяхната двойствена природа – като полезни или вредни микробни агенти.

За постигане на целта са формулирани следните задачи:

1. Изолране и идентифициране на ентерококови изолати от различни хабитати.

2. Изследване на характеристики на ентерококите, асоциирани с потенциал за причиняване на заболявания:

2.1. Скрининг за гени, асоциирани с ентерококовата вирулентност и проучване на фенотипната им проява.

2.2. Определяне на фенотипна антибиотична резистентност на изолатите.

2.2. Изследване на разпространението на гени за антибиотична резистентност.

2.3. Определяне разпространението и функционалността на CRISPR системите в ентерококи с различен произход.

2.4. Характеризиране на гени, подпомагащи хоризонталния генен трансфер.

3. Изследване на характеристики на ентерококите, асоциирани с пробиотичния потенциал:

3.1. Определяне на антимикробната активност на ентерококите при ко-култивиране в среда с патогенни микроорганизми.

3.2. Определяне природата на антибактериалните вещества, както и тяхната устойчивост към различни физични и химични фактори на средата.

3.3. Подбор на потенциални пробиотични щамове и определяне на тяхната безопасност.

Материали и методи

Материали

1. Микроорганизми

За определяне на биологичния потенциал на ентерококите (като важни вектори за хоризонтален трансфер на гени за антибиотична резистентност и вирулентност, както и пробиотичните им свойства) обект на изследването са 72 ентерококови щама, изолирани от различни екологични ниши. За целта на настоящата дисертация са подбрани следните хабитати: интестинален тракт на охлюв в различни етапи от жизнения му цикъл, кисели млека, прясно мляко, дюнер, прясно краве сирене, зряло козе сирене и кърма. Тези хабитати са определени с цел проследяване на промените, които настъпват в биологичния потенциал на ентерококите при преминаване през различни биологични царства (растения → безгръбначни → бозайници).

Изолатите от интестиналния тракт на охлюв, както и част от изолатите от кисели млека са изолирани в предишни изследвания и са предоставени от колекцията на катедра „Обща и промишлена микробиология” към Биологически факултет на Софийски университет „Св. Климент Охридски”. Останалите щамове са новоизолирани от храни и кърма в настоящото изследване.

В тази дисертация са използвани седем референтни щама: *E. faecalis* NBIMCC 3915 и *E. faecium* NBIMCC 8754 като положителни контроли за родова и видова идентификация чрез PCR; *Bacillus cereus* NBIMCC 1085 като положителна контрола за β - хемолитична активност; *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 като положителна контрола за ДНК-азна активност и като тест микроорганизъм при изследване на антибактериалните свойства на ентерококите; *Listeria innocua* NBIMCC 8755, *Escherichia coli* ATCC 8739 и *Salmonella enterica* serovar Enteritidis NBIMCC 8692 като тест микроорганизми при изследване на антибактериалните свойства на ентерококите. Като положителна контрола за сравнение на пробиотичния потенциал на ентерококите е използван щам *E. faecium* W54, изолиран от пробиотика Omnibiotik, продаван в търговската мрежа.

2. Хранителни среди

MRS бульон и агар (HiMedia, Mumbai, India)

Компонентен състав (g/L): Глюкоза - 20g; Дрождев екстракт - 5g; Месен екстракт - 10g; Пептон - 10g; Tween 80 - 1g; Натриев ацетат - 5g; Диамониев ацетат - 2g; Калиевхидрогенфосфат - 2g; Магнезиев сулфат - 0,2g; Манганов сулфат - 0,05g; Агар - 15g; pH-6,2/6,6

Стерилизира се при 1 атм. за 20 минути на 121°C.

Slanetz and Bartley (HiMedia Inc., Mumbai, India)

Компонентен състав (g/L): Триптон - 20g; Дрождев екстракт - 5g; Декстроза (Глюкоза) - 2g; Динатриев хидроген фосфат - 4g; Натриев азид - 0,4g; 2,3,5- Трифенил тетразол хлорид - 0,1g; Агар - 15g; pH- 7,2/7,4

Средата се кипва, за да се разтвори. Не се автоклавира!

VHI агар (HiMedia Inc., Mumbai, India)

Компонентен състав (g/L): Инфузия от телешко сърце - 500g; Триптон - 10g; Натриев хлорид - 5g; Агар - 15g; pH - 7,4 ± 0,2

Стерилизира се при 1 атм. за 20 минути на 121°C.

Eliker бульон и агар (HiMedia Inc., Mumbai, India)

Компонентен състав (g/L): Триптон - 20g; Дрождев екстракт - 5g; Желатин - 2,5g; Декстроза - 5g; Лактоза - 5g; Захароз а- 5g; Натриев хлорид - 4g; Натриев ацетат - 1,5g; Аскорбилова киселина - 0,5g; Агар - 15g; pH-6,8 ± 0,2

Стерилизира се при 1 атм. за 20 минути на 121°C.

Muller Hinton агар (HiMedia Inc., Mumbai, India)

Компонентен състав (g/L): Hm infusion B - 300g; Ациказа - 17,5g; Нишесте - 1.5g; Агар - 15g; pH - 7,3 ± 0,1

Стерилизира се при 1 атм. за 20 минути на 121°C.

Columbia agar с 5% конска кръв (HiMedia Inc., Mumbai, India)

Компонентен състав (g/L): Пептон - 25g; Скорбяла - 1g; Натриев хлорид - 5g; Агар - 10.25g; pH- 7,3 ± 0,2

DNase тест агар (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA)

Компонентен състав (g/L): Триптон - 20g; Дезоксирибонуклеинова киселина - 2g; Натриев хлорид - 5g; Агар 15g; Метиленово зелено - 0,05g; pH - 7,3

Стерилизира се при 1 атм. за 20 минути на 121°C.

Агар за желатиназна активност

Компонентен състав (g/L): Пептон - 5g (Merck, Darmstadt, Germany); Желатин - 30g (Difco, Detroit, MI, USA); Дрождев екстракт т- 3g (Gibco, Paisley, Scotland); Агар - 15g; pH- 7,0 (Plant agar, Duchefa Biochemie, The Netherlands).

Стерилизира се при 1 атм. за 20 минути на 121°C.

Eliker soft agar (Eliker broth + agar)

Компонентен състав (g/L): Триптон - 20g; Дрождев екстракт - 5g; Желатин - 2,5g; Декстроза - 5g; Лактоза - 5g; Захароза - 5g; Натриев хлорид - 4g; Натриев ацетат - 1,5g; Аскорбилова киселина - 0,5g; Агар - 4,5g (Plant agar, Duchefa Biochemie, The Netherlands); pH-6,8 ± 0,2

Стерилизира се при 1 атм. за 20 минути на 121°C.

TSA soft agar (TSA broth + agar)

Компонентен състав (g/L): Пептон от казеин - 17g; Пептон от соя - 3g; Глюкоза - 2,5g; Натриев хлорид - 5g; Калиев хидроген фосфат - 2,5g Агар - 4,5g (Plant agar, Duchefa Biochemie, The Netherlands); pH-7,3 ± 0,2

Стерилизира се при 1 атм. за 20 минути на 121°C.

3. Използвани антибиотични дискове

Табл. 1: Използвани антибиотични дискове за антибиограми по метода на Kirby–Bauer.

<i>Наименование на антибиотика</i>	<i>Концентрация</i>	<i>Съкращение</i>	<i>Стандарт</i>	<i>Други</i>
<i>Ампицилин (HiMedia Inc., Mumbai, India)</i>	2 µg/disc	(AMP)	EUCAST 2024	
<i>Импинем (HiMedia Inc., Mumbai, India)</i>	10 µg/disc	(IPM)	EUCAST 2024	
<i>Ципрофлоксацин (HiMedia Inc., Mumbai, India)</i>	5 µg/disc	(CP)	EUCAST 2024	
<i>Левифлоксацин (HiMedia Inc., Mumbai, India)</i>	5 µg/disc	(LE)	EUCAST 2024	
<i>Норфлоксацин (HiMedia Inc., Mumbai, India)</i>	10 µg/disc	(NX)	EUCAST 2024	
<i>Гентамицин (HiMedia Inc., Mumbai, India)</i>	30 µg/disc	(GEN)	EUCAST 2024	Тест за резистентност към високи концентрации на гентамицин
<i>Стрептомицин (HiMedia Inc., Mumbai, India)</i>	300 µg/disc	(HLS)	EUCAST 2024	Тест за резистентност към високи концентрации на стрептомицин
<i>Тейкопланин (HiMedia Inc., Mumbai, India)</i>	30 µg/disc	(TEI)	EUCAST 2024	

<p><i>Ванкомицин</i> (Oxoid Limited, Wade Road, Basingstoke, Hampshire, UK)</p>	5 µg/disc	(VA)	EUCAST 2024
<p><i>Хинупристин-далфопристин</i> (HiMedia Inc., Mumbai, India)</p>	15 µg/disc	(RP)	EUCAST 2024
<p><i>Еравациклин</i> (Mast Group Ltd., Mast House, Derby Road, Bootle, Merseyside, UK)</p>	20 µg/disc	(ERV)	EUCAST 2024
<p><i>Тиגעциклин</i> (HiMedia Inc., Mumbai, India)</p>	15 µg/disc	(TG)	EUCAST 2024
<p><i>Линезолид</i> (HiMedia Inc., Mumbai, India)</p>	10 µg/disc	(LZ)	EUCAST 2024
<p><i>Нитрофурантоин</i> (HiMedia Inc., Mumbai, India)</p>	100 µg/disc	(NIT)	EUCAST 2024
<p><i>Триметоприм</i> (HiMedia Inc., Mumbai, India)</p>	5 µg/disc	(TR)	EUCAST 2024
<p><i>Тетрациклин</i> (HiMedia Inc., Mumbai, India)</p>	30 µg/disc	(TE)	CLSI 2024

Методи

1. Пробовземане, изолиране на бактериални култури и тяхното съхранение

За изолиране на ентерококовите видове са използвани общо 27 проби от гастроинтестиналния тракт на животни (безгръбначни тревопасни видове *Cornu aspersum* в етапа на аестивация и хибернация от жизнения им цикъл) и от храни (кисело мляко, краве и козе сирене - прясно и зряло, респективно; дюнер; прясно мляко и майчина кърма). Пробите от кърма са предоставени от банката за майчина кърма в България, а пробите от храна са взети на случаен принцип от занаятчийски пазари. От катедрата по „Обща и промишлена микробиология“ в Биологически факултет на Софийски университет са предоставени изолатите от охлюва, както и част от изолатите от кисели млека. Приблизително 1g или 1ml от всяка проба е хомогенизиран във физиологичен разтвор (в съотношение 1:9) и всички проби са директно култивирани върху селективна хранителна среда Slanetz and Bartley (HiMedia Inc., Mumbai, India). Изходните проби са разреждени и от всяко разреждане е посято по 0.1ml на плътен посев върху селективна хранителна среда Slanetz and Bartley (HiMedia Inc., Mumbai, India). Петритата са култивирани при 37°C за 24h-48h. За селектирането на ентерококовите щамове, като положителен резултат, са подбрани тъмни червено-кафяви колонии. След двойно пречистване, са изолирани чисти култури от отделни колонии като потенциални ентерококови видове. След макроморфологично описване, културите са инокулирани в течна хранителна среда MRS (HiMedia, Mumbai, India) за краткосрочно съхранение. Така получените култури са съхранявани в течна хранителна среда MRS (HiMedia, Mumbai, India) при 4 C°. За по-продължително съхранение, културите са поставени в криоепруветки ROTI Store (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany) и съхранявани на -20 C°.

2. Изолиране на ДНК от бактериалните култури

Бактериалните култури са култивирани в MRS бульон (HiMedia, Mumbai, India) при 37°C за 24 часа преди екстракцията на геномната ДНК. Биомасата е събрана чрез центрофугиране при 10,000 × g, след което е промита двукратно с 500 µl 1M NaCl. Екстракцията на тоталната ДНК е осъществена чрез E.Z.N.A. Bacterial DNA Kit (Omega Biotek Inc., 400 Pinnacte Way, Suite 450,

Norcross, GA, USA) съгласно инструкциите на производителя. За подобряване на лизирането на клетките, към стъпката на ензимен лизис са добавени 2 μL 1000 units/mg мутанолизин (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

3. Подходи за висока идентификация на изолатите

Изолатите са идентифицирани чрез три различни метода: PCR с родово- и видово-специфични праймери, 16S рРНК секвениране и MALDI-TOFF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight) мас спектрометрия. Родово- и видово-специфичните PCR-и са извършени в тотален реакционен обем от 25 μl , съдържащ ултрачиста H_2O , 0.5 μL (5 pmol/ μL) от всеки праймер, 6.5 μL Red Taq Master Mix (VWR International bvba/sprl, Haasrode Researchpark Zone 3, Geldenaaksebaan 464 B-3001, Haasrode Belgium) и 1 μL от изолираната ДНК. Реакционните условия са както следва: начална денатурация при 95°C за 5 min, последвана от 25 цикъла на денатурация при 94°C за 45s, свързване на праймерите при 58°C, 50°C, 60°C и 55°C, спрямо спецификациите на праймерите за съответно видово-специфични праймери за *Enterococcus casseliflavus* (CA1/CA2), видово-специфични праймери за *Enterococcus faecalis*, родово-специфичните праймери (E1/E2) и видово-специфични праймери за *Enterococcus faecium* (Efm1/Efm2) (Koleva et al., 2014; Jackson et al., 2004), за 45s, стъпка на елонгация при 72°C за 45s и финална стъпка на елонгация при 72°C за 7 min. Амплификационните продукти са разделени в 1.5% агарозен гел чрез електрофореза при 100V за 30min. За визуализиране на продуктите, агарозният гел е оцветен с етидиев бромид и визуализиран под UV светлина. Използван е молекулен маркер 100 bp DNA ladder (SERVA FastLoad 100 bp DNA ladder, SERVA Electrophoresis GmbH, Carl-Benz-Str. 7, Heidelberg, Germany). За амплификация на 16s РНК гена са използвани универсалните праймери 9F и 1542R (Koleva et al., 2014). Продуктите са пречистени и секвенирани в Macrogen Europe, Meibergdreef 57 1105 BA, Amsterdam, The Netherlands. Получените секвенции са подложени на сравнителни анализи чрез nucleotide BLAST.

4. Анализирани на разпространението на CRISPR локусите и CRISPR-асоциираните белтъци чрез PCR

Чрез PCR е детектирано наличието на три CRISPR локуса (CRISPR1, CRISPR2 и CRISPR3) и асоциираните *cas* гени за CRISPR1 и CRISPR3. Реакционните условия са следните: начална денатурация при 94°C за 10 min, последвана от 30 цикъла на денатурация при 94°C за 45s, свързване на праймерите при 49°C, 54°C и 52°C, според спецификациите на праймерите (Huescas et al., 2019), за 45s, стъпка на елонгация при 72°C за 45s и финална стъпка на елонгация при 72°C за 7 min. PCR-ите са извършени в тотален реакционен обем от 25 µl, съдържащ ултрачиста H₂O, 0.5 µL (5 pmol/µL) от всеки праймер, 6.5 µL Red Taq Master Mix (VWR International bvba/sprl, Haasrode Researchpark Zone 3, Geldenaaksebaan 464 B-3001, Haasrode Belgium) и 1 µL от изолираната ДНК. Амплификационните продукти са разделени в 1.5% агарозен гел чрез електрофореза при 100V за 30min. За визуализиране на продуктите, гелът е оцветен с етидиев бромид и визуализиран под UV светлина. Използван е молекулен маркер 100 bp DNA ladder (SERVA FastLoad 100 bp DNA ladder, SERVA Electrophoresis GmbH, Carl-Benz-Str. 7, Heidelberg, Germany).

5. Детекция на мобилни генетични елементи чрез PCR

Анализирано е наличието на гени за полови феромони (*cpd*, *cob* и *ccf*), агрегационни вещества (*agg*, *asa1*, *prgB* и *asa373*), Tn916–1545 транспозонното семейство (*Int-Tn*, интегративния ген) и феромон-индуцируемия плазмид pCF10 (*prgW*, гена за инициаторния белтък на репликация), определящи възможността на изолатите за трансфер на гени за антибиотична резистентност и вирулентност. Реакционните условия са както следва: начална денатурация при 94°C за 10 min, последвана от 30 цикъла на денатурация при 94°C за 45 s, свързване на праймерите при 54 °C, 52 °C, 50 °C, 61 °C, 53 °C и 55 °C, спрямо спецификациите на праймерите (Doherty et al., 2000; Eaton et al., 2001; Billström et al., 2008; Heaton et al., 1996; Creti et al., 2004; Jensen et al., 2010), за 45 s, стъпка на елонгация при 72°C за 45 s и финална стъпка на елонгация при 72°C за 7 min. PCR-ите са извършени в тотален реакционен обем от 25 µl, съдържащ ултрачиста H₂O, 0.5 µL (5 pmol/µL) от всеки праймер, 6.5 µL Red Taq Master Mix (VWR International bvba/sprl, Haasrode Researchpark Zone 3, Geldenaaksebaan 464 B-3001, Haasrode Belgium) и 1 µL от изолираната ДНК. Амплификационните продукти са разделени в 1.5%

агарозен гел чрез електрофореза при 100V за 30min. За визуализиране на продуктите, гелът е оцветен с етидиев бромид и визуализиран под UV светлина. Използван е молекулен маркер 100 bp DNA ladder (SERVA FastLoad 100 bp DNA ladder, SERVA Electrophoresis GmbH, Carl-Benz-Str. 7, Heidelberg, Germany).

6. Детекция на гени за вирулентност чрез PCR

Извършен е PCR за детектиране на 8 гена за вирулентност (*cylB*, *esp*, *gls24*, *nuc1*, *psaA*, *agg*, *gelE*, и *ace*) в анализирани изолати. Реакционните условия са както следва: начална денатурация при 95°C за 5 min, последвана от 25 цикъла на денатурация при 94°C за 45s, свързване на праймерите при 57°C, 57°C, 54°C, 54°C, 54°C, 51°C, 51°C и 62°C спрямо спецификациите на праймерите (McBride et al., 2007; Eaton et al., 2001; Mannu et al., 2003), за 45s, стъпка на елонгация при 72°C за 45s и финална стъпка на елонгация при 72°C за 7 min. PCR-ите са извършени в тотален реакционен обем от 25 µl, съдържащ ултрачиста H₂O, 0.5 µL (5 pmol/µL) от всеки праймер, 6.5 µL Red Taq Master Mix (VWR International bvba/sprl, Haasrode Researchpark Zone 3, Geldenaaksebaan 464 B-3001, Haasrode Belgium) и 1 µL от изолираната ДНК. Амплификационните продукти са разделени в 1.5% агарозен гел чрез електрофореза при 100V за 30min. За визуализиране на продуктите, гелът е оцветен с етидиев бромид и визуализиран под UV светлина. Използван е молекулен маркер 100 bp DNA ladder (SERVA FastLoad 100 bp DNA ladder, SERVA Electrophoresis GmbH, Carl-Benz-Str. 7, Heidelberg, Germany).

7. Желатиназна активност

Анализът за фенотипна желатиназна активност е извършен спрямо процедурите описани от Lopes и сътр. (Lopes et al., 2006). Чистите бактериални култури са култивирани за 24h при 37°C върху твърда хранителна среда ВНІ (HiMedia Inc., Mumbai, India), за получаване на култури в логаритмична фаза на растеж. Културите са инокулирани на spot върху петритата с агар за определяне на желатиназната активност и са инкубирани за 48h при 37°C. След култивиране, агаровата повърхност е залята с концентриран разтвор на (NH₃)₂SO₄ (55 g/100 mL dH₂O). Продуктите на желатиназа формират чиста зона около spot-а и тези резултати се интерпретират като положителни.

8. Цитолитична активност

Анализът за цитолитична активност е извършен спрямо Carrillo и сътр. (Carrillo et al., 1996). За получаване на култури в логаритмична фаза на растеж, чистите култури са култивирани за 24h при 37°C върху твърда хранителна среда ВНИ (HiMedia Inc., Mumbai, India). Културите са инокулирани на spot върху петрита с Columbia агар с 5% конска кръв (HiMedia Inc., Mumbai, India) и са инкубирани за 48h при 37°C. След това културите са наблюдавани за поява на хемолизни зони. Чистите зони на хидролиза около колониите са интерпретирани като β -хемолиза (положителен резултат), а липсата на зона като γ -хемолиза (отрицателен резултат). При появата на зелени зони, щамовете са отчетени като α -хемолитични, а резултата е приет за отрицателен за наличието на β -хемолиза (Mangia et al., 2019).

9. ДНК-азна активност

Анализът за фенотипната експресия на *nucl* гена и съответно ДНК-азна активност на изолатите е извършен спрямо Batish и сътр. (Batish et al., 1982). За получаване на култури в логаритмична фаза на растеж, чистите култури са култивирани за 24h при 37°C върху твърда хранителна среда ВНИ (HiMedia Inc., Mumbai, India). Културите са инокулирани на spot върху петрита с метил-зелено (Honeywell Riedel-de Haen AG, Wunstorfer Str. 40, D-30926 Seelze) ДНК-азен агар (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA) и са инкубирани за 24h при 37°C. За положителен резултат се отчитат култури, които показват зона на обезцветяване около spot-а.

10. Определяне на фенотипна чувствителност/резистентност на ентерококите към различни групи антибиотици

Анализът за чувствителност към антибиотични вещества е извършен съгласно диск дифузионния метод на Kirby–Bauer (Bauer et al., 1966). За определяне на антибиотичната резистентност на ентерококовите изолати са подбрани 16 антибиотика. Процедурата за тестването на антибиотичната чувствителност, заедно с интерпретацията на резултатите, е извършена спрямо насоките на Европейския комитет за тестване на антимикробна чувствителност от 2023 г. (EUCAST Version 13.1, 2023). Тъй като в тези стандарти не е заложена тетрациклинова чувствителност по метода на Kirby–Bauer, тя е анализирана спрямо CLSI M100-Ed34 стандартите от 2024 г. (CLSI M100-Ed34, 2024). Накратко, приготвени са

бактериални култури в логаритмична фаза на растеж с приблизителна концентрация 10^8 CFU/mL (0.5 единици по MacFarland). Върху петрита с 25 ml твърда хранителна среда Muller Hinton (HiMedia Inc., Mumbai, India) е направен плътен посев с помощта на стерилни тампони, като културите са посетени в три различни посоки на петритото. Върху посятите култури са поставени дискове с антибиотик. Петритата са инкубирани за 24h при 37°C. Диаметърът на зоните на инхибиране е измерен и щамовете са класифицирани като резистентни и чувствителни спрямо критериите на двата стандарта.

11. Детекция на гени за антибиотична резистентност чрез PCR

Извършен е PCR за 9 гена, свързани с антибиотичната резистентност (*erm*, *ermB*, *blaZ*, *vanA*, *aphA*, *mefA*, *gyrA*, *cat_{PIP501}*, и *aacb'-aph2''*), общо представени в клинични и природни щамове на ентерококи. Реакционните условия са както следва: начална денатурация при 95°C за 5 min, последвана от 25 цикъла на денатурация при 94°C за 45 s, свързване на праймерите при 65°C, 55°C, 60°C, 50°C, 55°C, 55°C, 52°C, 52°C и 65°C спрямо спецификациите на праймерите (McBride et al., 2007; van Asselt et al., 1992; Garofalo et al., 2007; Aarestrup et al., 2000; Jensen et al., 1999; Jia et al., 2014; Liu et al., 2009), за 45 s, стъпка на елонгация при 72°C за 45 s и финална стъпка на елонгация при 72°C за 7 min. PCR-ите са извършени в тотален реакционен обем от 25 µl, съдържащ ултрачиста H₂O, 0.5 µL (5 pmol/µL) от всеки праймер, 6.5 µl Red Taq Master Mix (VWR International bvba/sprl, Haasrode Researchpark Zone 3, Geldenaaksebaan 464 B-3001, Haasrode Belgium) и 1 µL от изолираната ДНК. Амплификационните продукти са разделени в 1.5% агарозен гел чрез електрофореза при 100V за 30min. За визуализиране на продуктите, гелът е оцветен с етидиев бромид и визуализиран под UV светлина. Използван е молекулен маркер 100 bp DNA ladder (SERVA FastLoad 100 bp DNA ladder, SERVA Electrophoresis GmbH, Carl-Benz-Str. 7, Heidelberg, Germany).

Генотипната резистентност към тетрациклин е определена чрез детекция на седем различни гена за тетрациклинова резистентност съгласно Aarestrup et al., (2000), Aminov et al., (2001) и Doherty et al., (2000). Реакционните условия са както следва: начална денатурация при 94°C за 10 min, последвана от 30 цикъла на денатурация при 94°C за 45 s, свързване на праймерите при 45 °C, 57 °C, 56 °C, 58 °C, 59 °C и 42 °C спрямо спецификациите на праймерите, за 45s, стъпка на елонгация при 72°C за 45s и финална стъпка на елонгация при 72°C за 7 min. PCR-ите са извършени в тотален реакционен обем от 25 µl, съдържащ ултрачиста H₂O, 0.5 µL

(5 pmol/μL) от всеки праймер, 6.5 μL Red Taq Master Mix (VWR International bvba/sprl, Haasrode Researchpark Zone 3, Geldenaaksebaan 464 B-3001, Haasrode Belgium) и 1 μL от изолираната ДНК. Амплификационните продукти са разделени в 1.5% агарозен гел чрез електрофореза при 100 V за 30 min. За визуализиране на продуктите, гелът е оцветен с етидиев бромид и визуализиран под UV светлина. Използван е молекулен маркер 100 bp DNA ladder (SERVA FastLoad 100 bp DNA ladder, SERVA Electrophoresis GmbH, Carl-Benz-Str. 7, Heidelberg, Germany).

12. Целогеномно секвениране и биоинформатична обработка на секвенциите

Геномите на селектираните щамове (*E. faecalis* CA4, BM5, BM12 и BM15 и *E. mundtii* CA8 и CA17) са секвенирани дълговерижно чрез Nanopore Minion Mk1B. Геномите са асемблирани чрез Flye версия 2.9.5 (Lin et al., 2016) в Galaxy платформата. Полирането на секвенциите е извършено чрез Minimap версия 2.2.8 (Li & Durbin, 2010), Racon версия 1.5.0 (Vaser et al., 2017) и Medaka версия 1.7.2 (Oxford Nanopore Technologies Ltd. Medaka, 2020). Обработените секвенции на щамове от вида *E. faecalis* са депозирани в NCBI Genome с одобрени номера за достъп както, следва: CP173761-CP173764 (*E. faecalis* CM4); CP173669-CP173671 (*E. faecalis* BM5); CP173666-CP173668 (*E. faecalis* BM12); CP173758-CP173760 (*E. faecalis* BM15). Геномните секвенции на изолатите, принадлежащи към вида *E. mundtii*, предстои да бъдат депозирани. Кръговите и линейните представяния на секвенциите са генерирани чрез CGView.js (Stothard et al., 2019) в Proksee (Grant et al., 2023). Филогенетичното дърво на база 16S участъка е конструирано чрез MEGA11 (Tamura et al., 2021). Еволюционните връзки са анализирани по Maximum Likelihood метода и Hasegawa-Kishino-Yano модела (Kimura, 1980). Показано е дървото с най-голяма log-вероятност (-2183.64). Целогеномните филогенетични анализи и дървета са генерирани чрез FastME 2.1.6.1 (Lefort et al., 2015) в Type (Strain) Genome Server (TYGS) (Meier-Kolthoff и Göker, 2019). И при двата вида филогении, секвенциите са сравнени чрез MUSCLE алгоритъма. За характеризиране на гените за антибиотична резистентност на секвенираните щамове е използван CARD (Comprehensive Antibiotic Resistance Database) в Proksee (Alcock et al., 2023). Идентификацията на мобилни генетични елементи е извършена чрез MobileElementFinder v1.0.3 софтуера. Плазмидите са

идентифицирани посредством PlasmidFinder версия 2.0.1 (Carattoli et al., 2014; Camacho et al., 2009) на базата на специфичните им начала на репликация, след което са потвърдени чрез BLASTN в NCBI базата данни. Изследването на CRISPR системите, включително наличието на CRISPR локуси и *cas* гени е извършено чрез анализ на асемблираните геноми с CRISPRCasFinder 4.2.20 софтуера (Couvin et al., 2018). За идентифициране на потенциалните CRISPR целеви молекули е използвано CRISPRTarget (Biswas et al., 2013) с json файловете от CRISPRCasFinder. За сравнение на спейсърните последователности са използвани Genbank-Phage, RefSeq-Plasmid и IMGVR базите данни (настройките по подразбиране). Неидентифицираните спейсъри са обект на анализ в BLASTN в NCBI базата данни. Подтипирането на CRISPR повторите е извършено чрез RepeatTyper (Russel et al., 2020). Вторичните РНК структури на повторите са предвидени чрез RNAfold web сървър с настройки по подразбиране (Gruber et al., 2008). Детектирането и идентифицирането на гени, кодиращи антибактериални вещества в генома на секвенираните бактерии е извършено в BAGEL4 уебсървър (van Heel et al., 2018). Гените в областите на интерес са идентифицирани и визуализирани отново чрез BAGEL4 уебсървър. 3D структурата на мундтицина е генерирана чрез AlphaFold платформата (Varadi et al., 2024).

13. Статистически анализи

За сравняване на броя на гените на антибиотична резистентност и вирулентност, полови феромони и агрегационни вещества, както фенотипните профили на антибиотична резистентност на изолатите с различен произход и видова принадлежност е използван *t*-теста на Welch. Резултатите се смятат за значими когато $p < 0.05$. Броят на CRISPR локусите е анализиран по същия начин.

14. Антибактериална активност на ентерококите при ко-култивиране с мест микроорганизми

За определяне на антибактериалната активност на ентерококовите щамове спрямо тест микроорганизми (*Listeria innocua* NBIMCC 8755, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella enterica* serovar Enteritidis NBIMCC 8692 и *Staphylococcus aureus* ATCC 6538) е извършено ко-култивиране върху твърда хранителна среда. За целта ентерококовите щамове са инокулирани

на spot върху твърда хранителна среда и са инкубирани за 24h при 37°C. След периода на инкубация, петритата са залети с 3ml soft agar (0.45% ВНІ агар, за *Listeria innocua* е използвана хранителна среда E liker), съдържащ 500µl 10⁸cfu/ml от съответния целеви микроорганизъм. След застиване на агара, петритата са инкубирани за 24h при 37°C. След инкубиране е измерена големината за зоните на инхибиране.

15. Определяне на антибактериалната активност на безклетъчните супернатанти

Използвани са 24h култури на изследваните щамове ентерококи, набогатени в течна хранителна среда MRS (HiMedia, Mumbai, India). След центрофугиране при 6 000 x g за 10 min, супернатантата е разделена на две: едната част е неутрализирана до рН 6, докато другата е оставена в кисело рН (без промяна). Така получените супернатанти са филтрувани през 0.45µm бактериален филтър и използвани за по-нататъшни анализи. За по-дълго съхранение, супернатантите са съхранявани при -20°C.

Получените безклетъчни супернатанти са тествани за антибактериална активност срещу селектирани индикаторни бактериални щамове (*L. innocua* NBIMCC 8755, *E. coli* ATCC 8739, *S. enterica* Enteritidis NBIMCC 8692 и *S. aureus* ATCC 6538) по дифузионния метод на агаровите ямки. Накратко, 25ml твърда хранителна среда ВНІ (HiMedia Inc., Mumbai, India) (за *L. innocua* е използвана твърда хранителна среда E liker (HiMedia Inc., Mumbai, India)) е инокулирана дълбочинно с 1ml 10⁸cfu/ml от съответната индикаторна бактерия. След застиване и втвърдяване на агара, са направени ямки чрез тапопробивач. От всяка проба са накапани както киселите, така и неутрализираните безклетъчни супернатанти в ямките (по 50µl). За дифузия на течността в агара, петритата са инкубирани в хладилник за 30 min, след което са преместени в термостат за 24 h при 37°C. След инкубиране, петритата са отчетени за поява на зона на инхибиране около ямките. При наличие на такава, големината на зоните е измерена.

16. Определяне на устойчивостта на антибактериалните вещества към температура, сърфактанти и третиране с ензими

За определяне на физико-химичните характеристики на антибактериалното вещество, както и неговата природа, е анализирана активността им спрямо различни температури, сърфактантни и ензими.

За определяне на ефекта на ензими, са използвани пепсин (Fisher Scientific UK Ltd, Bishop Meadow Road, Loughborough), трипсин (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA) и протеиназа К (Sigma-Aldrich Brasil Ltda., São Paulo, Brazil). Ензимите са разтворени в стерилна вода и са добавени към използваните безклетъчни супернатанти като е достигната финална концентрация от 1mg/ml. Всички супернатанти са тествани в рН оптимума на всеки един от използваните ензими. Като контрола, същото количество стерилна дестилирана вода е добавена към супернатантите. Така направените разтвори са инкубирани за 1 час при 37°C. След инкубиране супернатантите са тествани по агар-дифузионния метод описан по-горе, и отново са доведени до рН 6. Тъй като пепсинът е единственият от използваните ензими, активен при крайно ниски концентрации на рН (рН 2), като контрола е тествана супернатанта с рН 2 без наличие на пепсин за тестване на запазване/загуба на антилистерийната си активност.

За определяне на ефекта на температурата, безклетъчните супернатанти са третирани при 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C и 100°C за 10 min и при 121 °C за 20 min (в автоклав). За контрола е използвана супернатанта на стайна температура. След инкубиране супернатантите са охладени до стайна температура и тествани по агар-дифузионни метод описан по-горе.

За определяне на ефекта на сърфактантите, безклетъчните супернатанти са третирани с урея, SDS (Sigma-Aldrich Brasil Ltda., São Paulo, Brazil), EDTA („Биомед фючар“ ЕООД, гр. София, България) и Tween 80 (Fisher Scientific UK Ltd, Bishop Meadow Road, Loughborough). За тази цел е направен сток разтвор от 2% от изследваните сърфактанти. Така получените разтвори са смесени в съотношение 1:1 с бактериалните супернатанти. Като контрола, в същото съотношение към супернатантата е добавено стерилна вода. Пробите са инкубирани на стайна температура за 3h и след това са тествани по агар-дифузионния метод, описан по-горе.

17. Определяне динамиката на биосинтеза на антибактериално вещество

Използвани са 24h култури на продуцента на антибактериално вещество (*E. mundtii* CA17) и на тест култура на *L. innocua* NBIMCC 8755. Продуцентът на антибактериални вещества е инокулиран в течна хранителна среда MRS (HiMedia, Mumbai, India) с концентрация 10^8 cfu/ml от *E. mundtii* CA17. Инокулиран е 1% от така приготвената суспензия. Така инокулираната среда е инкубирана на 37°C , като на всеки 3h е измервана оптичната плътност при 600 nm, а част от супернатантата е центрофугирана, филтрувана през $0.45\mu\text{m}$ бактериален филтър, неутрализирано е нейното рН и са направени двукратни разреждания във физиологичен разтвор. *L. innocua* е инокулирана дълбочинно в твърда хранителна среда Eliket (HiMedia Inc., Mumbai, India) (1ml от 10^8 cfu/ml суспензия на 24h култура на *L. innocua*). След охлаждане и стягане на агаровата среда на spot са накапани по $10\mu\text{l}$ от така приготвените супернатанти и техните разреждания. Петритата са култивирани за 24h при 37°C . След изтичане на инкубационния период е отчетено количеството на продуцираното антибактериално вещество в арбитарни единици на милилитър (AU ml^{-1}). Една арбитарна единица е дефинирана като реципрочната стойност на най-високото разреждане на бактериоцина, показващо зона на инхибиране на растежа на индикаторния щам (*L. innocua*). Арбитарните единици са изчислени спрямо Ansari et al. (2018) по формулата:

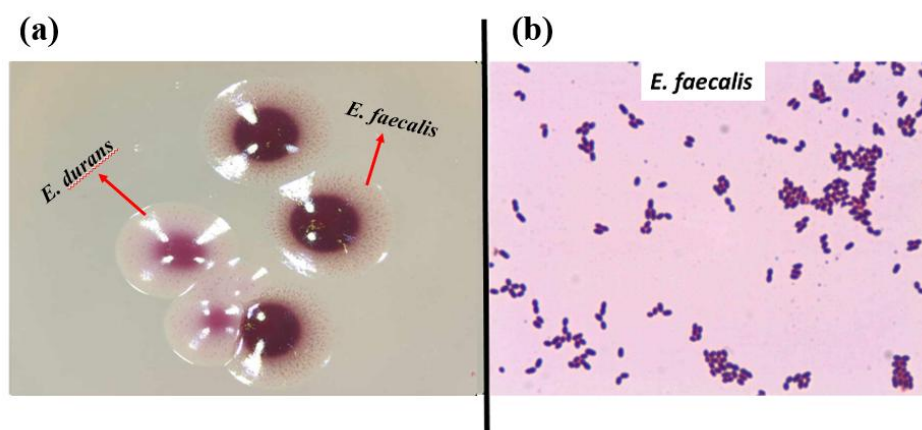
$$\text{Арбитарни единици (AU/ml)} = \frac{\text{Реципрочната стойност на най – високото разреждане}}{\text{Количеството използван бактериоцин (10\mu\text{l})}} \times 1000$$

Освен оптичната плътност на културата и количеството синтезиран бактериоцин, е проследено и продукцията на киселини, като при на всеки 3 часа е измервано и рН на културалната течност.

Резултати

I. Изолране и видова идентификация на ентерококовата колекция

Обект на настоящото изследване са 72 ентерококови щама, изолирани от 7 различни екологични ниши. От гастроинтестиналния тракт (ГИТ) на охлюви (*C. aspersum*), в етапи на хибернация и аестивация, са анализирани 17 щама. Тези изолати са предоставени от колекцията на катедра „Обща и промишлена микробиология“ и са изолирани в предишни изследвания (Koleva et al., 2014). От различни хранителни източници са изолирани нови 39 щама, като 27 от тях представляват изолати от различни български кисели млека, 2 от зряло краве сирене, 5 от прясно краве сирене, 1 от дюнер и 4 от краве прясно мляко. В настоящото изследване от майчина кърма са изолирани 16 ентерококови щама. Последните са приети като ентерококи с човешки и неклиничен произход. Макроморфологичният анализ показва, че всички изолати образуват розови или тъмно червени колонии при култивиране на селективна хранителна среда Slanetz и Bartley (**Фигура 10a**). Микроморфологично, всички щамове са определени като Грам-положителни коки или кокобацили, групирани в клъстери, верижки или по двойки (**Фигура 10b**).



Фиг. 1: **(a)** Макроморфология на щамове YFC1 (*E. faecalis*) и YFC2 (*E. durans*) върху селективна хранителна среда Slanetz и Bartley; **(b)** Микроморфология (оцветяване по Грам) на щам YFC3 (*E. faecalis*, изолиран от прясно краве сирене).

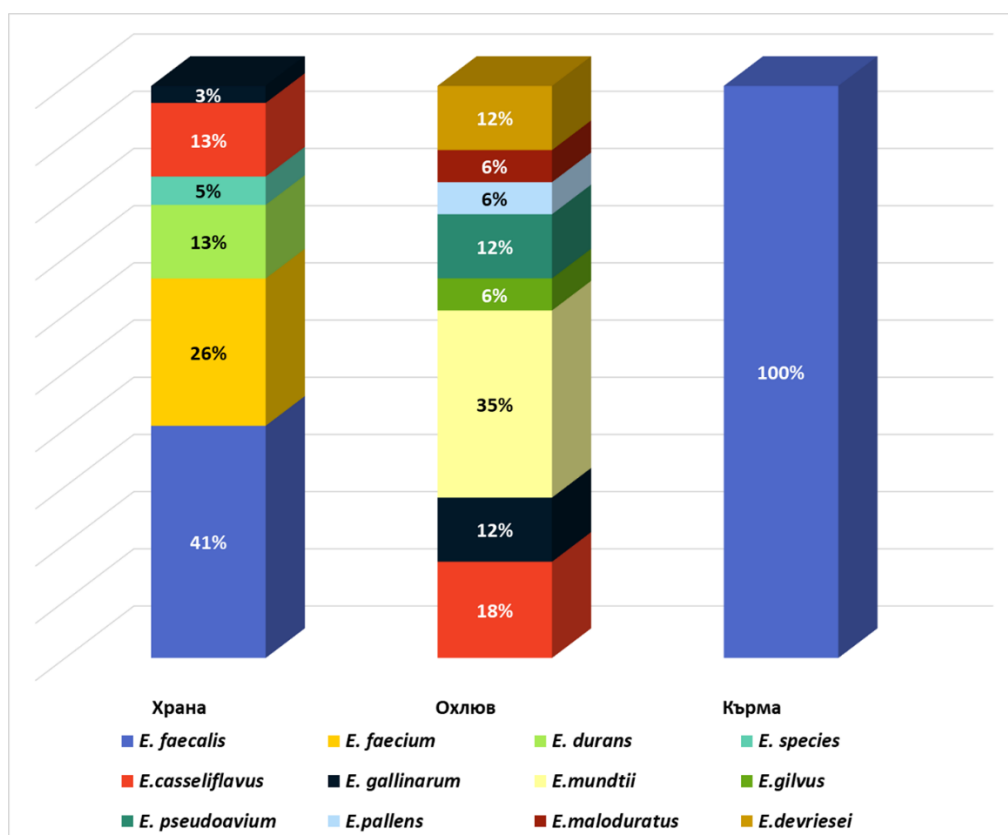
За видовата идентификация на изолатите са използвани три различни подхода: PCR с родо- и видово- специфични праймери, 16S рДНК секвениране и MALDI-TOF маспектрометрия. Всички 72 изолата генерират родо специфичен фрагмент от 1100 bp , което потвърждава тяхната принадлежност към род *Enterococcus*. Сравнителният BLAST анализ на получените резултати от секвенирането на 11 щама показва над 98-99% сходство с описани в базата данни ентерококови видове. Идентификацията на 12 щама чрез MALDI-TOF дава идентификационен индекс над 2.0, което представлява надеждна идентификация на ниво вид. Амплификацията с видово-специфични праймери определи до вид 49 изолата. Подробна информация за получената видова идентификация на изследваните ентерококови популации е представена в **Таблица 5**.

Табл. 2: Видова идентификация на изолатите

No	Изолати	Произход	Видове	Метод на идентификация	No	Изолати	Произход	Видове	Метод на идентификация
1	CA1	<i>Cornu aspersum</i>	<i>E. mundtii</i>	MALDI-TOF	37	BY8	Кисело мляко	<i>Enterococcus sp.</i>	Секвениране
2	CA2	<i>Cornu aspersum</i>	<i>E.casseliflavus</i>	PCR	38	BY9	Кисело мляко	<i>E.casseliflavus</i>	Секвениране
3	CA3	<i>Cornu aspersum</i>	<i>E.gilvus</i>	MALDI-TOF	39	BY10	Кисело мляко	<i>E.faecalis</i>	PCR
4	CA4	<i>Cornu aspersum</i>	<i>E.mundtii</i>	MALDI-TOF	40	BY11	Кисело мляко	<i>E.faecalis</i>	PCR
5	CA5	<i>Cornu aspersum</i>	<i>E.casseliflavus</i>	Секвениране	41	BY12	Кисело мляко	<i>E.faecium</i>	PCR
6	CA6	<i>Cornu aspersum</i>	<i>E.mundtii</i>	Секвениране	42	BY13	Кисело мляко	<i>E.faecium</i>	PCR
7	CA7	<i>Cornu aspersum</i>	<i>E.mundtii</i>	MALDI-TOF	43	BY14	Кисело мляко	<i>E.faecium</i>	PCR
8	CA8	<i>Cornu aspersum</i>	<i>E. mundtii</i>	Секвениране	44	BY15	Кисело мляко	<i>E.faecium</i>	PCR
9	CA9	<i>Cornu aspersum</i>	<i>E. pseudoavium</i>	Секвениране	45	BY16	Кисело мляко	<i>E.faecium</i>	PCR
10	CA10	<i>Cornu aspersum</i>	<i>E.pallens</i>	Секвениране	46	BY17	Кисело мляко	<i>E. gallinarum</i>	MALDI-TOF
11	CA11	<i>Cornu aspersum</i>	<i>E.maloduratus</i>	MALDI-TOF	47	BY18	Кисело мляко	<i>E. casseliflavus</i>	PCR
12	CA12	<i>Cornu aspersum</i>	<i>E.casseliflavus</i>	PCR	48	BY19	Кисело мляко	<i>E. casseliflavus</i>	PCR
13	CA13	<i>Cornu aspersum</i>	<i>E.devriesei</i>	Секвениране	49	BY20	Кисело мляко	<i>E. casseliflavus</i>	PCR
14	CA14	<i>Cornu aspersum</i>	<i>E.gallinarum</i>	Секвениране	50	BY21	Кисело мляко	<i>E. casseliflavus</i>	PCR
15	CA15	<i>Cornu aspersum</i>	<i>E.gallinarum</i>	Секвениране	51	BY22	Кисело мляко	<i>E.faecalis</i>	PCR
16	CA16	<i>Cornu aspersum</i>	<i>E.devriesei</i>	MALDI-TOF	52	BY23	Кисело мляко	<i>E.faecalis</i>	PCR
17	CA17	<i>Cornu aspersum</i>	<i>E.mundtii</i>	MALDI-TOF	53	BY24	Кисело мляко	<i>E.faecalis</i>	PCR
18	CM1	Краве прясно мляко	<i>E.faecium</i>	PCR	54	BY25	Кисело мляко	<i>E.faecalis</i>	PCR
19	CM2	Краве прясно мляко	<i>E. durans</i>	MALDI-TOF	55	BY26	Кисело мляко	<i>E.faecalis</i>	PCR
20	CM3	Краве прясно мляко	<i>E. durans</i>	MALDI-TOF	56	BY27	Кисело мляко	<i>E.faecalis</i>	PCR

21	CM4	Краве прясно мляко	<i>E.faecalis</i>	MALDI-TOF	57	BM1	Кърма	<i>E. faecalis</i>	PCR
22	YFC1	Прясно краве сирене	<i>E.faecalis</i>	PCR	58	BM2	Кърма	<i>E. faecalis</i>	PCR
23	YFC2	Прясно краве сирене	<i>E. durans</i>	PCR	59	BM3	Кърма	<i>E. faecalis</i>	PCR
24	YFC3	Прясно краве сирене	<i>E.faecalis</i>	PCR	60	BM4	Кърма	<i>E. faecalis</i>	PCR
25	YFC4	Прясно краве сирене	<i>E. durans</i>	PCR	61	BM5	Кърма	<i>E. faecalis</i>	PCR
26	YFC5	Прясно краве сирене	<i>E. durans</i>	PCR	62	BM6	Кърма	<i>E. faecalis</i>	PCR
27	MFC1	Зряло козе сирене	<i>E. faecium</i>	PCR	63	BM7	Кърма	<i>E. faecalis</i>	PCR
28	MFC2	Зряло козе сирене	<i>E.faecium</i>	PCR	64	BM8	Кърма	<i>E. faecalis</i>	PCR
29	DK1	Дюнер	<i>E. faecium</i>	PCR	65	BM9	Кърма	<i>E. faecalis</i>	PCR
30	BY1	Кисело мляко	<i>E.faecium</i>	MALDI-TOF	66	BM10	Кърма	<i>E. faecalis</i>	PCR
31	BY2	Кисело мляко	<i>E.faecalis</i>	PCR	67	BM11	Кърма	<i>E. faecalis</i>	PCR
32	BY3	Кисело мляко	<i>E.faecalis</i>	PCR	68	BM12	Кърма	<i>E. faecalis</i>	PCR
33	BY4	Кисело мляко	<i>E.faecalis</i>	PCR	69	BM13	Кърма	<i>E. faecalis</i>	PCR
34	BY5	Кисело мляко	<i>E.faecalis</i>	PCR	70	BM14	Кърма	<i>E. faecalis</i>	PCR
35	BY6	Кисело мляко	<i>E.faecalis</i>	PCR	71	BM15	Кърма	<i>E. faecalis</i>	PCR
36	BY7	Кисело мляко	<i>Enterococcus sp.</i>	Секвениране	72	BM16	Кърма	<i>E. faecalis</i>	PCR

Въз основа на приложените подходи в анализиранията колекция са идентифицирани 11 ентерококови вида: *Enterococcus mundtii*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus gilvus*, *Enterococcus pseudoavium*, *Enterococcus pallens*, *Enterococcus malodoratus*, *Enterococcus devriesei*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecium* и *Enterococcus faecalis*. Два изолата са идентифицирани само до ниво род като *Enterococcus spp.* (BY7 и BY8, изолирани от българско кисело мляко). Най-голямо видово разнообразие се открива в ГИТ на охлюва (8 вида ентерококи) като 35% са от вида *E. mundtii*, 18% *E. casseliflavus*, 6% *E. gilvus*, 12% *E. pseudoavium*, 6% *E. pallens*, 6% *E. malodoratus*, 12% *E. devriesei* и 12% *E. gallinarum* (Фигура 11).



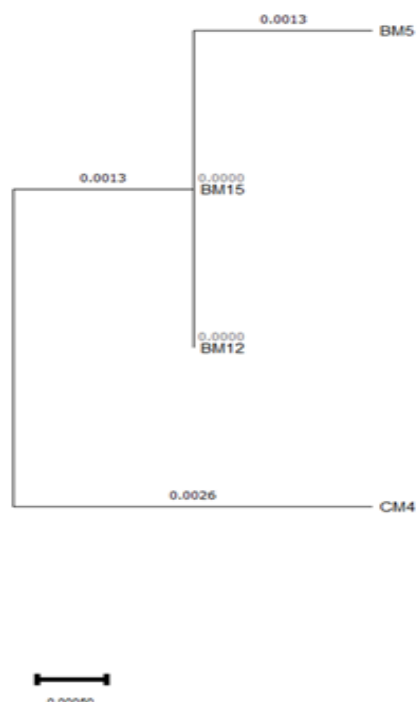
Фиг. 2: Видово разнообразие в анализиранияте хабитати

Видовете *E. mundtii* и *E. casseliflavus*, най-често приемани като растително-асоциирани ентерококи, представляват 53% от ентерококовата популация в ГИТ на охлюва, който е растителноядно животно. Другите 6 вида ентерококи, открити в интестиналния тракт на охлюва, са описани като изолати с човешки произход (Vuorranahalli et al., 2012). Може да се

предположи, че тези видове бактерии са попаднали върху растенията през почва и вода и от там, чрез храната са колонизирали ГИТ на охлюва (Chajęcka-Wierzchowska et al., 2021) .

Видът *E. casseliflavus* обаче може да бъде открит в различни млечни храни, като в настоящото изследване представлява 13% от ентерококовата популация, изолирана от тях. В научната литература този вид е докладван в прясно мляко от различни видове добитък (McAuley et al., 2019). Подобно, видът *E. gallinarum* се среща както в ГИТ на охлюва (12%), така и в различни храни (3%). Прави впечатление, че видовете *E. faecalis* и *E. faecium* не са изолирани от ГИТ на охлюва. За разлика от тази ниша, тези два вида са предимно изолирани и идентифицирани в анализирани проби от храни: 41% и 26% съответно. Видът *E. durans* (13%) в настоящото изследване е изолиран само от храни, като например проби от прясно краве мляко и прясно краве сирене. Всички изолати с човешки произход (от кърма) са идентифицирани само като представители на вида *E. faecalis*. Важен резервоар за разпространението на ентерококовите популации са продуктите от лактацията при бозайниците. Например, най-разпространените ентерококови видове, изолирани от козе и овче сурово мляко, както и техните продукти (сирена), са *E. faecalis* и *E. faecium* (Gołaś-Prądyńska et al., 2022). В пробите от краве мляко са детектирани три вида ентерококи - *E. faecalis*, *E. faecium* и *E. durans*. Това е в съответствие с резултатите на други автори (Gołaś-Prądyńska et al., 2022). Ентерококовото присъствие в майчината кърма обаче е слабо проучено. Кърмата има комплексна хранителна композиция и съдържа голямо разнообразие от бактериални видове, които повлияват здравето и имунитета на новородените (Martin et al., 2003). Някои автори дори предполагат, че ентерококовото присъствие в кърмата корелира с натрупването на наднормено тегло при новородените (Laursen et al., 2021). В кърмата на здрави жени е описано присъствието не само на видовете *E. faecalis* и *E. faecium*, но и на *Enterococcus hirae*, *E. casseliflavus* и *E. durans* (Laursen et al., 2021, Wajda et al., 2022, Huang et al., 2019). Според научната литература, от всички докладвани растително-асоциирани ентерококови видове, само *E. faecalis*, *E. faecium* и *E. casseliflavus* са доминантни и най-добре адаптирани към бозайниците (Laursen et al., 2021). Предполага се, че тази селекция се дължи на екстремната геномна пластичност на тези видове, позволяваща хоризонтален трансфер на гени (Cattoir, 2022). Въпреки това, в нашето проучване в майчината кърма са идентифицирани единствено представители на вида *E. faecalis*. Присъствието на тези видове в кърмата подсказва ранното колонизиране на

гастроинтестиналния тракт на човека. Видовете *E. faecalis* и *E. faecium* са индикатори за фекално замърсяване, тъй като са естествени колонизатори на гастроинтестиналния тракт на редица бозайници (de Kraker et al., 2013). Поради тази причина, може да допуснем, че в храните, в които е детектирано наличието на тези видове, има потенциално фекално замърсяване. Наличието на *E. faecalis* в кърма от български донори предполага животински произход на този вид. От друга страна, обаче, генотипното сравнение между щамове на *E. faecalis* от прясно мляко и кърма показва филогенетични различия.

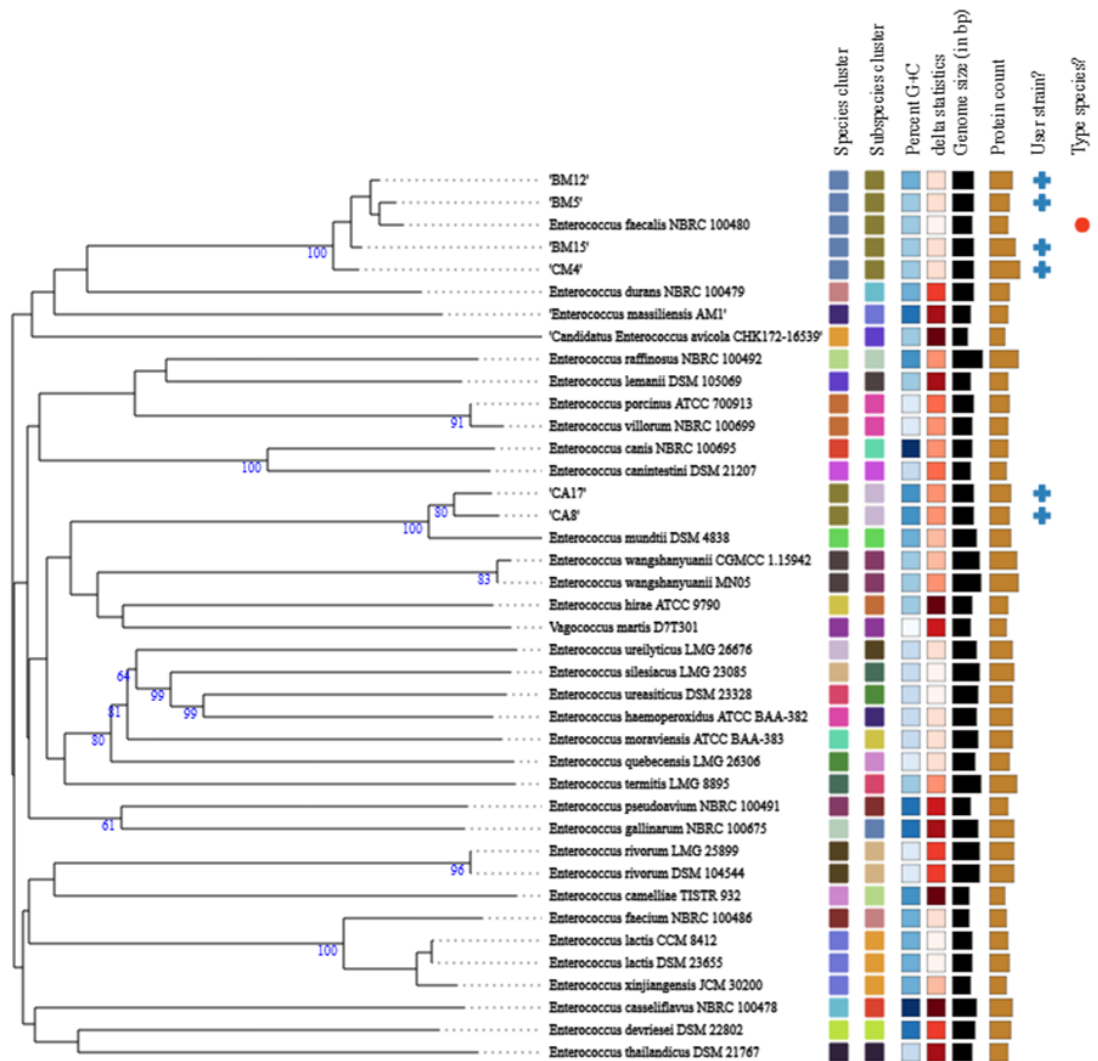


Фиг. 3: Филогенетични различия на изолати *E. faecalis* CM4, BM5, BM12 и BM15 на базата на участък от 16S рДНК. Еволюционната история е изведена чрез използване на метода на максималната вероятност и модела на Хасегава-Кишино-Яно (Hasegawa et al., 1985). Показано е дървото с най-висока логическа вероятност (-2183,64). Еволюционните анализи са проведени в MEGA11 (Tamura et al., 2021)

За проучване на филогенетичната връзка между щамовете от вида *E. faecalis*, е проведен анализ на целите секвенции на 16S рДНК на четири изолата: CM4, BM2, BM12 и BM15, които са целогеномно секвенирани. Анализът е проведен по модела на Hasegawa-Kishino-Yano, който е най-подходящ за генериране на филогенетични различия между щамовете, тъй като показва най-ниски критерии на Bayesian (4481.103) и Akaike (4420.513). На базата на получените филогенетични различия, изолатът от прясно краве мляко (*E. faecalis* CM4) се отделя от групата

на ентерококите, изолирани от кърма. Тези данни корелират с различния произход на изолатите. От групата на ентерококите, изолирани от кърма, щам *E. faecalis* VM5 също притежава еволюционни различия. Изолатите *E. faecalis* VM12 и *E. faecalis* VM15, изолирани от различни проби на кърма, обаче показват пълно сходство в своите 16S рДНК участъци (**Фигура 12**).

Филогенетичното сравнение между секвенциите на целите геноми на четирите щама *E. faecalis* (CM4, VM2, VM12 и VM15) и два щама *E. mundtii* (CA8 и CA17) с наличните в базата данни за геноми на ентерококи също показва отделяне на щам CM4 (от прясно мляко) от останалите изолати от кърма. В целогеномното сравнение обаче се наблюдава различно разпределение на щамове от кърма. Щамът *E. faecalis* VM5 показва най-близко еволюционно сходство с типовата култура *E. faecalis* NBRC 100480, докато щамове VM12 и VM15 попадат в различни клъстери, което показва наличие на щамово разнообразие (**Фигура 13**).



Фиг. 4: Филогенетични различия на изолати *E. faecalis* CM4, BM5, BM12, BM15 и *E. mundtii* CA8 и CA17 по секвенциите на пълните им геноми. Дървото е създадено чрез FastME 2.1.6.1 (Lefort et.al, 2015). Дължините на разклоненията са мащабирани по отношение на GBDP формулата за разстояние d5 (Farris, 1972.).

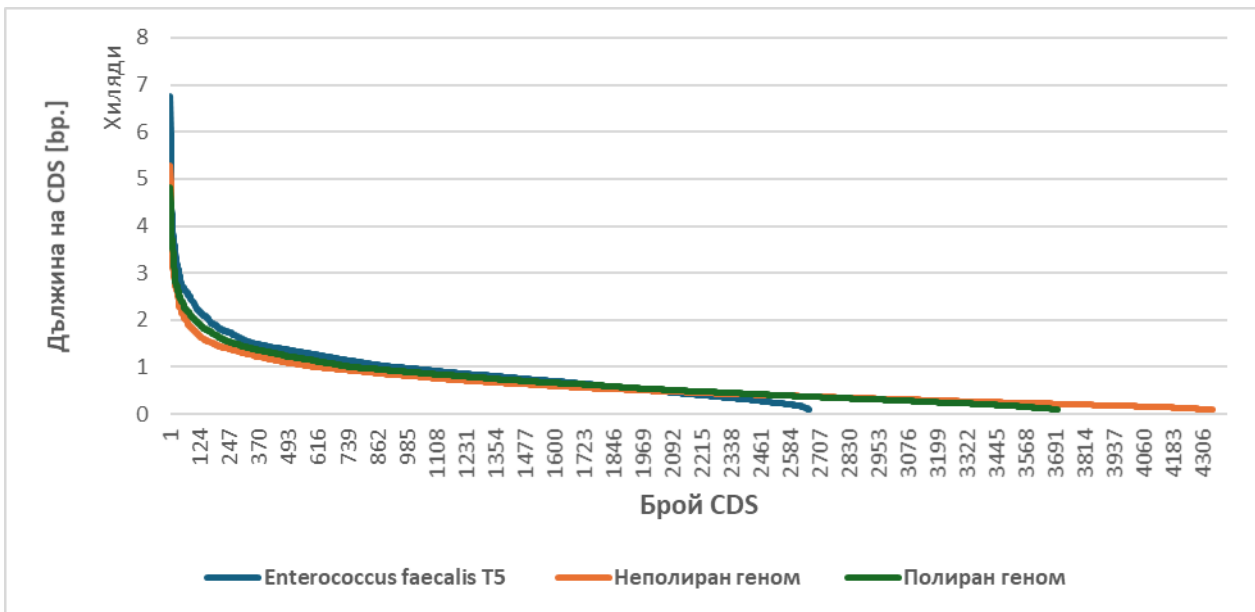
II. Целогеномно секвениране на избрани щамове и биоинформатична обработка

В настоящото изследване са секвенирани целогеномно 4 щамове *E. faecalis* (CM4, BM5, BM12 и BM15) и два щамове *E. mundtii* (CA8 и CA17). Получените пълни геномни последователности на щамовете потвърди отново тяхната видова идентификация. Геномите са получени с повече от 100x покритие. Всички бактериални хромозоми са с кръгова топология (**Приложения 1, 2, 3, 4 и 5**). Всички секвенирани щамове, представители на вида *E. faecalis*, имат хромозоми с дължина около 2.9МВ и GC съдържание средно 37% (CM4 - 37.49%; BM5 - 37.46%; BM12 - 37.7%; BM15 - 37.38%). Анализираният щамове от вида *E. mundtii* притежават хромозоми с дължина около 3МВ и GC съдържание 38.6%.

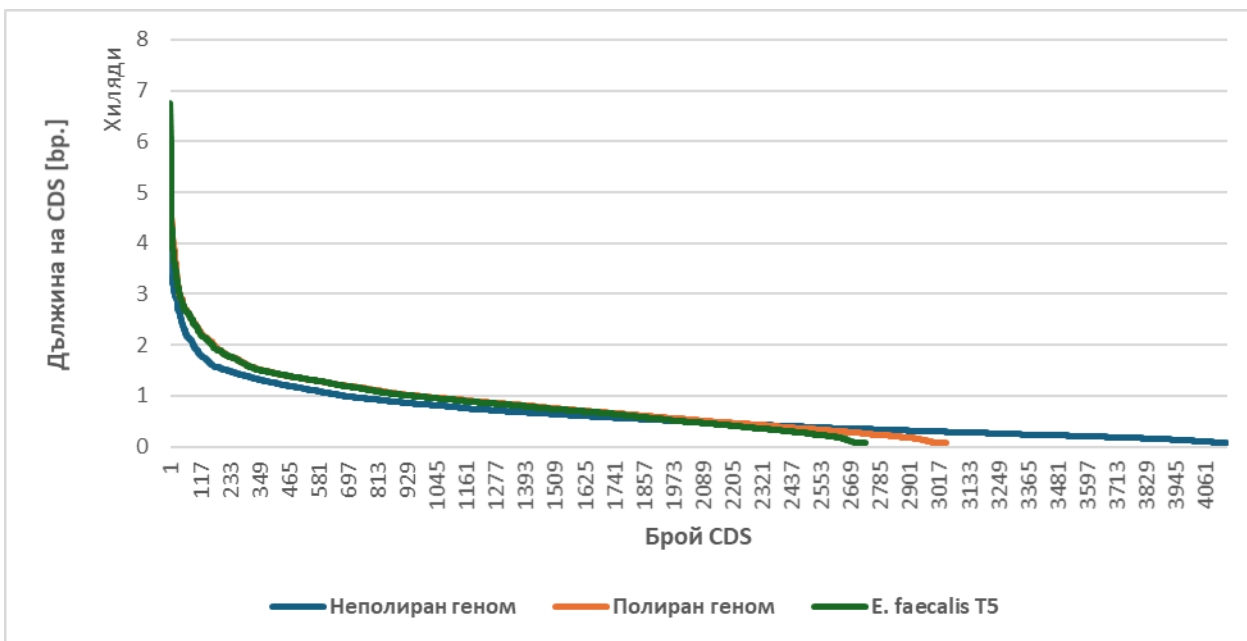
Асемблираните и анотирани секвенции на щамовете *E. faecalis* са депозирани в NCBI Genome с одобрени номера за достъп, както следва: CP173761-CP173764 (*E. faecalis* CM4); CP173669-CP173671 (*E. faecalis* BM5); CP173666-CP173668 (*E. faecalis* BM12); CP173758-CP173760 (*E. faecalis* 236 BM15). Геномите на щамовете от вида *E. mundtii* предстои да бъдат депозирани.

Дълговерижното Nanopore секвениране е известно с генерирането на множество псевдогени при получаване на геномните последователности. По тази причина е направена проверка и последващо полиране на секвенциите. След полиране на секвенциите се наблюдава намаляване на броя на кодиращите секвенции (CDS = coding sequences) (**Фигури 14 и 15**), отразено в намаляване на броя на хипотетичните белтъци. При щам *E. faecalis* CM4 броят на хипотетичните белтъци остава относително постоянен (n = 1853 преди полиране и n = 1856 след полиране); при щам *E. faecalis* BM5 броят на хипотетичните белтъци намалява с 37% (n = 1903 преди полиране и n = 1192 след полиране); при щам *E. faecalis* BM12 броят на хипотетичните белтъци намалява със 21% (n = 1744 преди полиране и n = 1375 след полиране); при щам *E. faecalis* BM15 броят на хипотетичните белтъци намалява със 23% (n = 1988 преди полиране и n = 1524 след полиране). При щамовете от вида *E. mundtii* отново се наблюдават подобни резултати: в щам *E. mundtii* CA 8 броят на хипотетичните белтъци намалява с 40% (n = 1959 преди полиране и n = 1170 след полиране); при щам *E. mundtii* CA17 броят на хипотетичните белтъци намалява с 35% (n = 2076 преди полиране и n = 1349 след полиране). Отражено е и

намаляване в дължината на кодиращите секвенции (Фигури 14 и 15), което е резултат от отстраняване на промени в рамките на четене или така наречените „frameshift“ мутации. В щам *E. faecalis* VM15 са детектирани 1356 псевдогена дължащи се на промяна в рамката на четене (45%) от общо 3028 кодиращи последователности преди полиране на генома. След полиране те намаляват със 61% - 827 псевдогена дължащи се на промяна в рамката на четене (28%) от общо 2978 кодиращи последователности. При щам *E. faecalis* CM4 преди полиране са детектирани 1296 псевдогена дължащи се на промяна в рамката на четене (40%) от общо 3071 кодиращи последователности. След полиране не се наблюдават значителни промени в броя на кодиращите последователности, както и в броя на псевдогените - 1255 псевдогени дължащи се на промяна в рамката на четене от общо 3072 кодиращи последователности. Въпреки полирането на тези геноми, не е достигнато препоръчителното процентно съдържание на псевдогените дължащи се на промяна в рамката на четене от < 10%. При останалите два *E. faecalis* генома (VM12 и VM5) обаче, този критерий е спазен.



Фиг. 5: Резултати от полиране на генома на *E. faecalis* VM15. CDS = кодиращи секвенции



Фиг. 6: Резултати от полирането на генома на щам *E. faecalis* BM5. CDS= кодиращи секвенции

Дълговерижното целогеномно секвениране чрез Nanopore от една страна е подходящо за анализиране на дълги участъци от ДНК (например CRISPR системи споменати по-долу), но от друга страна води до голям брой мутации, променящи рамката на четене, които затрудняват обработката и последващото аотиране на секвенциите. Повечето грешки при това секвениране са асоциирани с инсерции или делеции (индели), асоциирани с повторни геномни региони, като хомополимери, къси повтори или региони с високо GC съдържание, и са причинени от вариабилната скорост на транслокация на ДНК, преминавайки през нанопорите (Delahaye et al., 2021). Използваните инструменти за полиране на геномните секвенции (Racoon & Medaka) показват значително подобряване на качеството на секвенциите, намалявайки броя на frameshift мутациите, което води и до намаляване и на броя на хипотетичните белтъци. Тези инструменти обаче не са достатъчни за полирането на всички геноми, тъй като в геномите на CM4 и BM15 не са достигнати необходимите критерии. Потенциална стъпка за получаване на по-точни геномни секвенции е секвенирането на проблемни, по-къси участъци чрез платформи като Illumina. Късоверижното секвениране може да бъде по-точно и има различен профил на получените грешки при секвениране, но при него могат да се въведат нови грешки в повторените геномни региони (Watson & Warr, 2018). Въпреки това, този подход увеличава

разходите, труда и комплексността на процеса на полиране на секвенциите. През последните няколко години навлизат нови инструменти за полиране на такъв тип секвенции като например Nextpolish, PEPPER, Apollo, Homopolish, и NeuralPolish (Jiang et al., 2020, Shafin et al., 2021, Firtina et al., 2020, Huang Y. et al., 2021, Huang N. Et al., 2021). Това потвърждава и увеличаващата се употреба на Nanopore секвенирането като инструмент за бърза, качествена и евтина алтернатива за секвениране на цели геномни последователности.

В щамовете *E. mundtii* CA8 и CA17 не е открито присъствие на плазмидни секвенции. В тези щамове е асемблиран и аотиран само по един контиг, представляващ хромозомите на изолатите. В секвенираните щамове *E. faecalis* обаче са асемблирани от 2 до 3 плазида във всеки щам. Размерът на плазмидите варира от 5kB (p.Firmicutes2 в CM4) до 113kB (p.Firmicutes1 в CM4). Във всеки *E. faecalis* секвениран щам е открит поне по един феромон-зависим конюгативен плазмид (pFirmicutes1 в BM5 и CM4, pFirmicutes2 в BM12 и BM15). Във всеки един от тях са детектирани *prg* гени, обикновено съдържащи се във феромон-зависими плазмиди. От общо 9 асемблирани плазида, в 5 от тях са детектирани познати начала на репликация, налични в базите данни (консервативни гени в плазмидите) (**Таблица 6**).

Табл. 3: Идентифициране на секвенираните плазмидни секвенции. Идентифицирането на началото на репликация и плазмидното семейство е определено чрез PlasmidFinder версия 2.0.1.

Щам	Плазмидно семейство	Гени асоциирани с началото на репликация	Плазмид	Номера на секвенциите в NCBI	Секвенирани плазмиди	Идентичност
CM4	Rep3	rep6	pS86	AJ223161	pFirmicutes2	99.73%
	RepA_N	rep9a	pAD1	L01794	pFirmicutes1	96%
BM5	RepA_N	rep9b	pMG2200	AB374546	pFirmicutes1	99.69%
BM12	RepA_N	rep9c	pCF10	AY855841	pFirmicutes2	97.96%
BM15	Inc18	rep2	pRE25	X92945	pFirmicutes1	99.93%

Сравнението в NCBI базата данни с пълните секвенции на тези плазмиди показва висок процент на идентичност ($\geq 95\%$) в повечето от описаните плазмиди. Поради тази причина плазмидите, условно обозначени като pFirmicutes1 и pFirmicutes2 (в щам *E. faecalis* CM4), pFirmicutes1 (в щам *E. faecalis* BM5), pFirmicutes2 (в щам *E. faecalis* BM12) и pFirmicutes1 (в щам *E. faecalis* BM15) могат уверено да бъдат отнесени именно към идентифицираните

плазмиди (съответно pS86, pAD1, pMG2200, pCF10 и pRE25). Неуспехът в идентифицирането на останалите 4 плазмидни последователности може да се дължи на вече споменатите грешки, получени от дълговерижното Nanopore секвениране.

Плазмидът pS86 е описван в литературата като често срещан в Грам- положителните бактерии, както и в ентерококи, с животински произход (клинични изолати, в интестиналния тракт на бозайници, както и в мляко) (Martinez-Bueno et al. 2000, Song et al., 1999, Francia et al., 2002, Sprincova et al., 2005). Въпреки че с този плазмид към момента не са обвързани никакви фенотипни признаци (Sprincova et al., 2005), в тази разработка е идентифициран ген (*mafI*), част от токсин-антитоксин система. Генът *mafI* кодира белтък отговорен за имунитет към токсин, кодиран от гена *mafB*. В този плазмид е детектиран неизвестен към момента бактериоцин/токсин, както и още два гена с неизвестна към момента функция. Въпреки че *mafB-mafI* системата е асоциирана с род *Neisseria* (Jamet & Nassif, 2015), е възможно в щам *E. faecalis* CM4 да е закодиран друг тип токсин, близък до *mafB*. Важно е да се отбележи, че в щама не е детектиран *mafB* ген. Другият идентифициран в този щам плазмид (pAD1) е описван в литературата като носещ оперон за синтезата на цитолизин (Clewell, 2007). Такъв е идентифициран и описан и в тази дисертация (**глава III, точка 1**).

В тази дисертация плазмидът pMG2200 е описан като носещ CRISPR система (**глава V**) без гени за Cas белтъци (тип IV-A2). В литературата този плазмид е свързан с гени, кодиращи ванкомицинова резистентност (Zheng et al., 2009). В тази разработка обаче такива не са открити. Въпреки това плазмидът кодира други важни за клетката гени, отговорни за резистентност към високи температури и високо рН. Идентифицирани са и множество гени за липопротеини, както и ген, кодиращ лизозим.

pCF10 е още един плазмид, споменат в тази дисертация (**глава IV, точка 3**). Това е широко разпространен сред ентерококите плазмид описван като имащ ключова роля в разпространението на гени за тетрациклинова резистентност и вирулентност (Dunny et al., 2001). В нашите изследвания в този плазмид не са открити гени за тетрациклинова резистентност, но такива са открити в хромозомата на щама. В **глава III, точка 5** в тази дисертация е описан и мобилният характер на гените за тетрациклинова резистентност. Поради тази причина може да се предположи, че гените за тетрациклиновата резистентност са пренесени към хромозомата именно от този плазмид. Важно е да се отбележи, че в този плазмид

е детектиран генът *prgB*, асоцииран с вирулентния потенциал на ентерококите и отново споменат по-подробно в тази разработка.

Последният идентифициран в тази дисертация плазмид е pRE25. В литературата този плазмид е описан като носещ множество гени за антибиотична резистентност (Palmer et al., 2010). Такива са открити и в тази разработка. В този плазмид са идентифицирани 4 гена, определящи резистентност към различни антибиотици: еритромицин, хлорамфеникол, амикацин и стрептомицин.

III. Характеристики на ентерококите, асоциирани с потенциал за причиняване на заболявания

1. Скрининг за гени, асоциирани с ентерококовата вирулентност

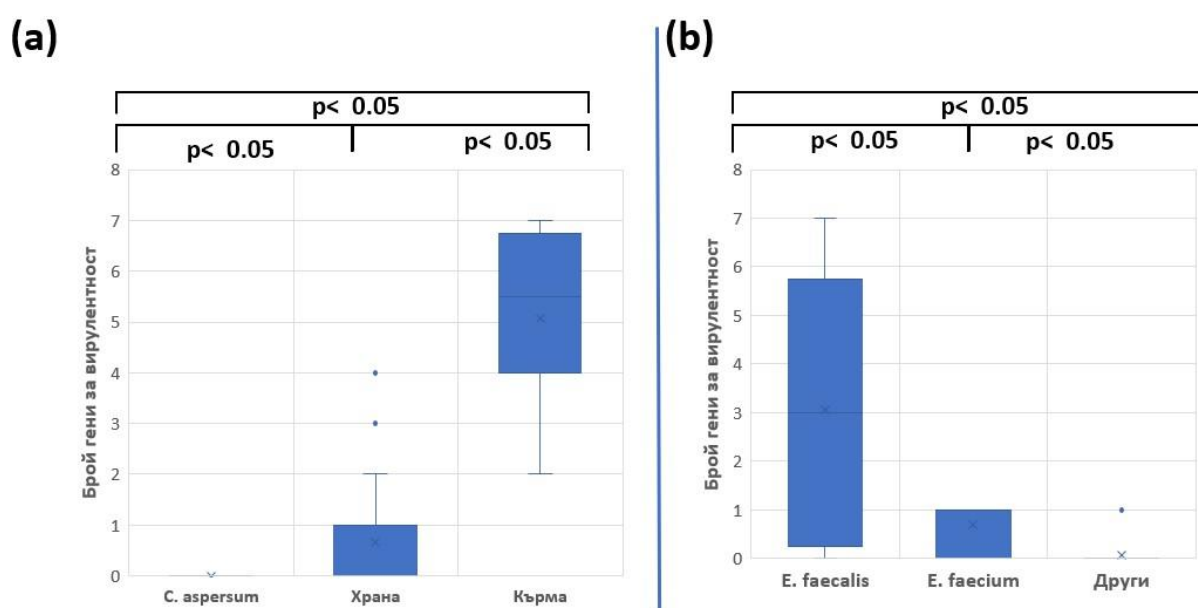
Степента на патогенност на микроорганизмите зависи от генетично детерминирани гени за вирулентност. В настоящото изследване е анализирано наличието на 8 гена за вирулентност (*cylB*, *esp*, *gls24*, *nuc1*, *psaA*, *agg*, *gelE* и *ace*) в ентерококовите изолати (Таблица 7). След обработка на данните се установи, че в 46% от щамовете се амплифицират различни гени за вирулентност. Изключение прави групата изолати от ГИТ на охлюв, които не притежават нито един от анализирани гени. Целогеномното секвениране на два щамата от тях (*E. mundtii* CA8 и CA17) потвърди тези резултати, тъй като в техния геном не са открити никакви гени, детерминиращи вирулентност. От осемте изследвани фактора, само регулаторът на стресовия белтък (*gls24-like*) не е открит в изследваните ентерококови популации. Най-често положителни амплификации в изследваните ентерококи са получени за гена за желатиназа (*gelE*) и Mn-транспортер (*psaA*): 31% и 28%, респективно. Двата гена, отговорни за синтезата на ентерококов повърхностен протеин (*esp*) и нуклеаза (*nuc1*), са представени в 19,4% от всички тествани изолати. Гените, отговорни за хемолитична активност (*cylB*) и колаген-свързващ белтък (*ace*), са детектирани в 18% от ентерококите. Генетичните детерминанти за агрегационно вещество (*agg*) са открити в 15,2% от тестваните изолати. В четири изолата от кърма (BM5, BM6, BM9 и BM10) са детектирани седем от общо осем скринирани гена за вирулентност.

Табл. 4: Разпределение на гени, кодиращи вирулентни фактори сред тестваните ентерококови популации

Щам	Гени за вирулентност								Щамове	Гени за вирулентност							
	<i>cyfB</i>	<i>esp</i>	<i>gls 24</i>	<i>nucI</i>	<i>psa</i>	<i>agg</i>	<i>gelE</i>	<i>ace</i>		<i>cyfB</i>	<i>esp</i>	<i>gls 24</i>	<i>nucI</i>	<i>psa</i>	<i>agg</i>	<i>gelE</i>	<i>ace</i>
<i>E. faecium</i> CM1									<i>E. faecalis</i> BY25								
<i>E. durans</i> CM2									<i>E. faecalis</i> BY26								
<i>E. durans</i> CM3									<i>E. faecalis</i> BY27								
<i>E. faecalis</i> CM4									<i>E. mundtii</i> CA1								
<i>E. faecalis</i> YFC1									<i>E. casseliflavus</i> CA2								
<i>E. durans</i> YFC2									<i>E. gilvus</i> CA3								
<i>E. faecalis</i> YFC3									<i>E. mundtii</i> CA4								
<i>E. durans</i> YFC4									<i>E. casseliflavus</i> CA5								
<i>E. durans</i> YFC5									<i>E. mundtii</i> CA6								
<i>E. faecium</i> MFC1									<i>E. mundtii</i> CA7								
<i>E. faecium</i> MFC2									<i>E. pseudoavium</i> CA8								
<i>E. faecium</i> DK1									<i>E. pseudoavium</i> CA9								
<i>E. faecium</i> BY1									<i>E. pallens</i> CA10								
<i>E. faecalis</i> BY2									<i>E. maloduratus</i> CA11								
<i>E. faecalis</i> BY3									<i>E. casseliflavus</i> CA12								
<i>E. faecalis</i> BY4									<i>E. devriesei</i> CA13								
<i>E. faecalis</i> BY5									<i>E. gallinarum</i> CA14								
<i>E. faecalis</i> BY6									<i>E. gallinarum</i> CA15								
<i>E. species</i> BY7									<i>E. devriesei</i> CA16								
<i>E. species</i> BY8									<i>E. mundtii</i> CA17								
<i>E. casseliflavus</i> BY9									<i>E. faecalis</i> BM1								
<i>E. faecalis</i> BY10									<i>E. faecalis</i> BM2								
<i>E. faecalis</i> BY11									<i>E. faecalis</i> BM3								
<i>E. faecium</i> BY12									<i>E. faecalis</i> BM4								
<i>E. faecium</i> BY13									<i>E. faecalis</i> BM5								
<i>E. faecium</i> BY14									<i>E. faecalis</i> BM6								
<i>E. faecium</i> BY15									<i>E. faecalis</i> BM7								
<i>E. faecium</i> BY16									<i>E. faecalis</i> BM8								
<i>E. gallinarum</i> BY17									<i>E. faecalis</i> BM9								
<i>E. casseliflavus</i> BY18									<i>E. faecalis</i> BM10								
<i>E. casseliflavus</i> BY19									<i>E. faecalis</i> BM11								
<i>E. casseliflavus</i> BY20									<i>E. faecalis</i> BM12								
<i>E. casseliflavus</i> BY21									<i>E. faecalis</i> BM13								
<i>E. faecalis</i> BY22									<i>E. faecalis</i> BM14								
<i>E. faecalis</i> BY23									<i>E. faecalis</i> BM15								
<i>E. faecalis</i> BY24									<i>E. faecalis</i> BM16								

С розов цвят- отрицателен резултат, не се наблюдава амплификационен продукт; зелен цвят- положителен резултат, наличие на специфичен амплификационен продукт.

Сравнителният анализ за разпространението на всички тествани гени за вирулентност сред хранителните изолати показва щамова специфичност. Сравнението за разпределението на гени за вирулентни фактори сред ентерококовите щамове, изолирани от различни екологични ниши показва значителни различия (между изолатите от охлюв и храна $p < 0.05$; храна и кърма $p < 0.05$; охлюв и кърма $p < 0.05$) (Фигура 16 а). Подобна тенденция се наблюдава между *E. faecalis* и *E. faecium* ($p < 0.05$); *E. faecium* и други ентерококови видове ($p < 0.05$); *E. faecalis* и други ентерококови видове ($p < 0.05$) (Фигура 16 б).



Фиг. 7: Сравнение на броя на гени за вирулентност между произхода на изолатите (а) и между различни ентерококови видове (б)

Целогеномното секвениране на четири изолата, представители на вида *E. faecalis* (СМ4, ВМ5, ВМ12 и ВМ15) позволи да бъдат детектирани допълнителни гени за вирулентност, извън изследваните чрез PCR. Във всички горепосочени изолати са открити гени, свързани със синтеза на пили, асоциирани с образуването на биофилми и ендокардит (*ebp* генен клъстер, *srtC*). В генома на тези изолати присъстват гените *fss1*, *fss2*, *fss3* (кодиращи фибриноген-свързващи белтъци), *efaA* (ендокардит специфичен антиген) и *bopD* (транскрипционен регулатор, повлияващ образуването на биофилми). Интересни са и наблюденията, свързани със *cps* оперона в тези щамове. Според настоящата научна литература, гените в този оперон са

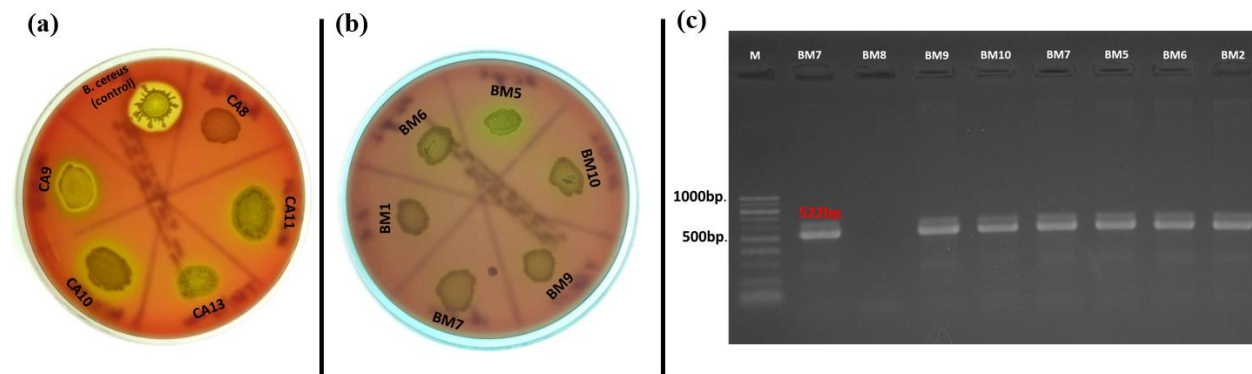
свързани с формирането на капсула в някои ентерококови изолати (Thurlow, Thomas & Hancock, 2009). Няколко мутагенни проучвания, както и хибридизационни анализи, описват Maekawa серотип 2 антигена като зависим от оперон, съставен от 9 гена (*cpsC-K*) (Hancock, Shepard & Gilmore, 2003). Мутантите по този оперон са описвани като по-чувствителни към фагоцитоза и притежават намалена способност за предизвикване на персистентни инфекции в мишки (Hancock & Gilmore, 2002). В последващи проучвания други автори доказват, че всички, с изключение на два гена от този оперон са незаменими за продукцията на капсула (Thurlow, Thomas & Hancock, 2009). Доказано е също, че наличието на CpsF белтък формира серологичната основа за различията между Maekawa серотип 2 и 5 капсулни антигени (Thurlow, Thomas & Hancock, 2009). Проучванията в тази дисертация откриват наличието на пълен оперон (включително наличието на гена *cpsF*) само в един от секвенираните изолати (*E. faecalis* CM4). Това определя този щам като Maekawa серотип 2 и го отличава от изолатите от кърма, които притежават само два гена от оперона (*cpsA* и *cpsB*). Изолатите от кърма са определени като Maekawa серотип 5. Това определя и тяхната неспособност да формират капсула. Тези резултати още веднъж потвърждават споменатите по-горе щамови различия между *E. faecalis* видовете от храна и тези с човешки произход по направените филогенетични анализи по 16S участъците, както и сравнявайки целите им геномни последователности. Тези проучвания определят изолатата от храна *E. faecalis* CM4 като притежаващ по-голям потенциал за причиняване на инфекции, за разлика от изолатите от кърма. Направените изследвания могат да обяснят и трудностите при лизирането на клетките в някои от изолатите, поради което е наложено и оптимизиране на клетъчния лизис с два ензими (лизозим и мутанолинин).

Резултатите от това проучване показват, че потенциално растително-асоциираните ентерококови изолати в интестиналния тракт на охлюва и в храните (като *E. casseliflavus*) не носят гени за вирулентност. Наблюдавани са значителни различия между ентерококовите щамове от различни източници, както и между различните видове (**Фигура 16**). Най-голям брой гени за вирулентност са детектирани в *E. faecalis* изолатите от кърма. Разпределението на гените за вирулентност в останалите щамове се определя както на видово, така и на щамово ниво. Сравнявайки броя на гените за вирулентност сред изолатите на *E. faecalis* и *E. faecium* от храни и човешки проби, може да бъде обобщено, че този брой значително се увеличава в последния вид изолати. Всички изолати от кърма носят гени за вирулентни фактори, а четири

от тях (*E. faecalis* BM5, BM6, BM9 и BM10) съдържат седем от осемте изследвани чрез PCR гена. Тези резултати се различават от публикуваните от Santana et al. (Santana et al., 2020). Те изследват разпределението на *ace*, *efaA*, *gelE*, *cylA*, *hyl* и *esp* гените за вирулентност сред ентерококови популации, изолирани от необработена майчина кърма и откриват, че в тях са разпространени само два от изследваните от тях гени: *efaA* и *ace*. Изследванията в тази дисертация описват още, че два щамове от прясно краве мляко - *E. durans* (CM2 и CM3), не носят нито един от изследваните гени за вирулентни фактори. За разлика от тях, два щамове от сирена - *E. durans* (YFC4 и YFC5), притежават *cylB* гена.

2. Наличие на *cylB* гена и продукция на хемолизин

Хемолитичната активност на ентерококовите видове се смята за един от основните вирулентни фактори, определящи техния патогенен характер. Нашите резултати показват отсъствие на фенотипна β -хемолитична активност върху Колумбия агар с 5% конска кръв, но някои щамове експресират α -хемолитична активност (31% от всички тествани щамове) (Фигура 17).



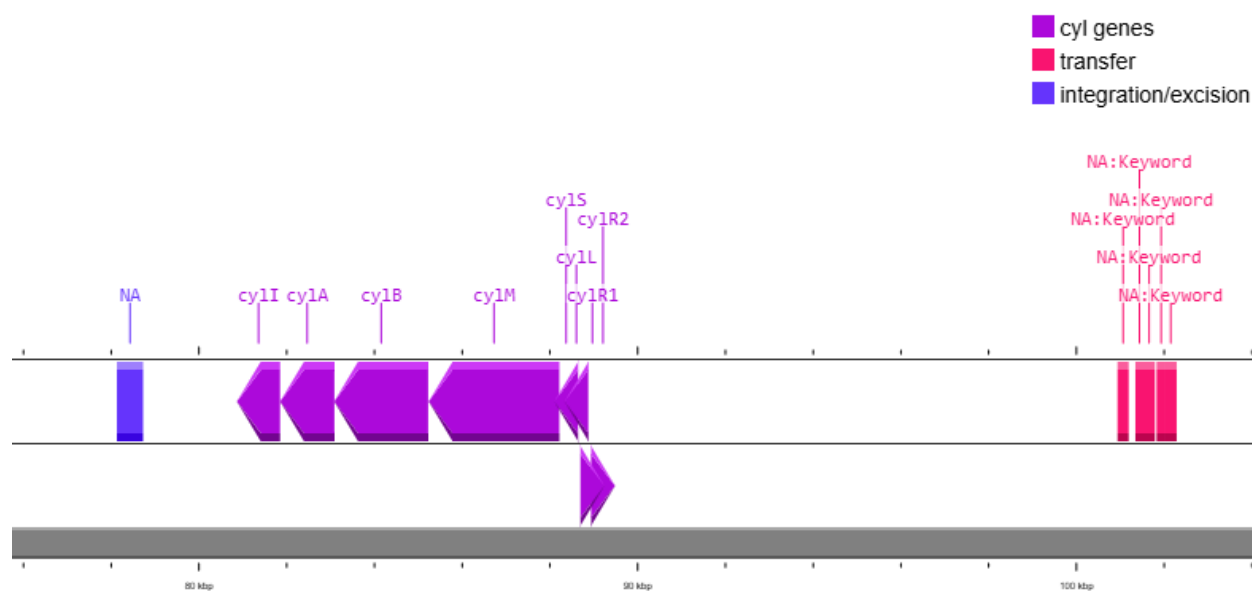
Фиг. 8: (а) Тест за хемолитична активност върху Columbia агар с 5% конска кръв; (б) α -хемолитична активност на *E. faecalis* изолати от кърма; (в) Гел електрофореза на PCR амплификационни продукти за *cylB* гена от изолати от кърма.

От всички 17 щамове, изолирани от охлюв, 10 изолата, които са представители на видовете *E. casseliflavus* (n = 2), *E. gilvus* (n = 1), *E. gallinarum* (n = 2), *E. pseudoavium* (n = 1), *E. pallens* (n = 1), *E. malodoratus* (n = 1) и *E. devriesei* (n = 2), показват фенотипна α -хемолитична активност. Единственият вид, изолиран от ГИТ на охлюва, който не показва хемолитична активност е растително-асоциирания *E. mundtii*. От всички 39 щамове изолирани от хранителни проби (прясно мляко, кисело мляко, прясно и зряло сирене, както и дюнере), 11 са α -хемолитични.

Такава активност се наблюдава сред видовете *E. durans* (YFC2), *E. casseliflavus* (BY19), *E. gallinarum* (BY17), *Enterococcus sp.* (BY8), *E. faecalis* (n = 4) и *E. faecium* (n = 3). Изненадващо, само един от изолираните щамове от майчина кърма показва α -хемолитична активност (*E. faecalis* BM5). Съществена е връзката между експресията на фенотипната хемолитична активност и свързаните с нея генотипни детерминанти. Генът *cylB* е част от *cyl* оперона, отговорен за синтеза на цитолизин и респективно за β -хемолитичната активност (Ferchichi et al., 2021). От всички тествани щамове, 13 притежават *cylB* гена (9 от майчина кърма и 4 от хранителни изолати), но нито един от тях не експресира β -хемолитична активност. Само два щамове (*E. faecium* DK1 и *E. faecalis* BM5) експресират α -хемолиза и едновременно с това притежават *cylB* гена. След целогеномно секвениране на 6-те избрани щамове от колекцията (*E. faecalis* CA4, BM5, BM12 и BM15, както и *E. mundtii* CA8 и CA17), два от щамовете с положителна PCR амплификация са потвърдени за наличието на *cyl* оперон - CM4 и BM5. При анализиране на цитолизиновия оперон, е детектиран пълния набор от гени (*cylL_L*, *cylL_S*, *cylM*, *cylB*, *cylA*, и *cylI*), необходим за неговата експресия, както и гените отговорни за регулацията му (*cylR1* и *cylR2*). Липсата на проява на фенотипна цитолизинова активност в анализираният щамове може да бъде обяснена чрез лабораторните условия на провеждане на експеримента. Някои автори описват нивата на кислород в средата като фактор, оказващ влияние върху експресията на цитолизиновия оперон при ентерококите (Day et al., 2003). Според тях, цитолизиновата активност е по-изявена при анаеробни или микроаерофилни условия на култивиране. В човешкия организъм се срещат много места с ниско съдържание на кислород. Такива са например червата, където преобладават ентерококите (Zheng et al., 2015), както и рани или абсцеси (Bowler et al., 2001). При запушване на уринарния тракт или при поставянето на катетри също могат да се развият микроаерофилни условия (Flores-Mireles et al., 2015), които индуцират продукцията на цитолизин, довеждайки до уринарни инфекции.

В двата секвенирани щамове гените за синтеза на цитолизин са разположени както върху плазмид (в rAD1 плазмид на *E. faecalis* CM4) (**Фигура 18**), така и в хромозомата (при *E. faecalis* BM5). Плазмидът rAD1 е добре описан в литературата именно като носител на цитолизиновия оперон при ентерококи (Clewell, 2007). Наличието на цитолизиновия оперон както в хромозомата, така и в плаزمидата, насочи нашето проучване на секвенциите към търсене на мобилни генетични елементи в близост до цитолизиновия оперон. Анализът показва, че

цитוליзиновият оперон е рамкиран от гени, свързани с трансфера на мобилни генетични елементи (**Фигура 18**). Тези данни още веднъж потвърждават еволюционната пластичност на ентерококите. Възможността за хоризонтален трансфер на цитוליзинов оперон, както между ентерококите, така и към други видове, е от съществено значение. Възможността за хоризонтален трансфер на тези гени би увеличила потенциала за вирулентност в бактериалните популации. В литературата цитוליзиновия оперон е първоначално описан като кодиран върху феромон-зависими плазмиди (Clewell, 1981; Ike et al., 1990), но наличието му в хромозомата на някои видове също е докладвано (Ike & Clewell, 1992). Хромозомно кодираният цитолизин е описан като разположен в големи острови на патогенност (Shankar et al., 2002). Тези данни потвърждават получените в тази дисертация резултати, описвайки цитוליзиновия оперон и мобилния му характер.

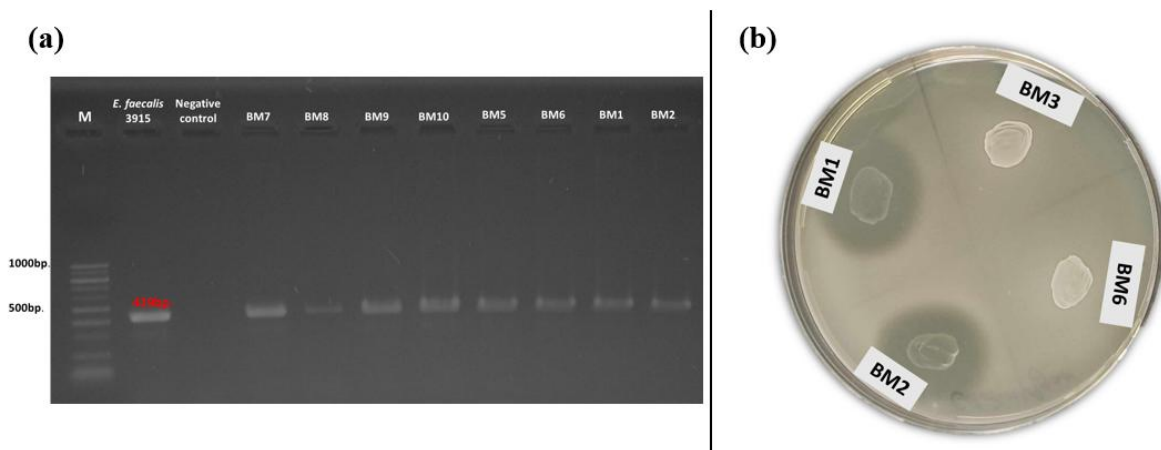


Фиг. 9: Генетична карта на разположението на цитוליзиновия оперон в pAD1 плазмид в шам *E. faecalis* CM4. Изображението е генерирано чрез Map Builder в Proksee 2.0.5.

3. Наличие на *gelE* ген, *fsr* оперон и продукция на желатиназа

За проучване на вирулентния потенциал на ентерококите е анализирана продукцията на желатиназа и наличието на *gelE* ген. Генът *gelE* детерминира експресията на екстрацелуларна желатиназа, която хидролизира желатин и колаген, както и други белтъчни субстрати. Положителна амплификация за *gelE* е получена при 35% от всички тествани изолати (**Фигура**

19а). От тях 11 са с хранителен произход, а 14 са изолирани от кърма. Всички щамове с положителна амплификация за гена *gelE* принадлежат към видовете *E. faecalis* и *E. faecium*. Нито един от изолатите от охлюв не генерира положителна амплификация за гореспоменатия ген. Едновременното наличие на фенотипна желатиназна активност и свързаната с нея генотипна детерминанта (*gelE*) се наблюдава само в три ентерококови щама (*E. faecalis* BM1, BM2 и BM11), изолирани от кърма (**Фигура 19b**).



Фиг. 10: (а) Гел електрофореза на PCR амплификационни продукти за *gelE* гена на изолати от кърма; (б) Фенотипна желатиназна активност на изолати от кърма (*E. faecalis* BM1 и BM2) върху желатинов агар.

След целогеномно секвениране на трите щама (*E. faecalis* CM4, BM5, BM12), които притежават *gelE* гена, но не го експресират, се установи непълен *fsr* оперон, който регулира експресията на *gelE* гена. В трите щама е установено наличието само на гените *fsrC* и *fsrE*, без гените *fsrA* и *fsrB*. Нещо повече, тези гени са разположени в хромозомите на щамовете в транспозона *tra905*.

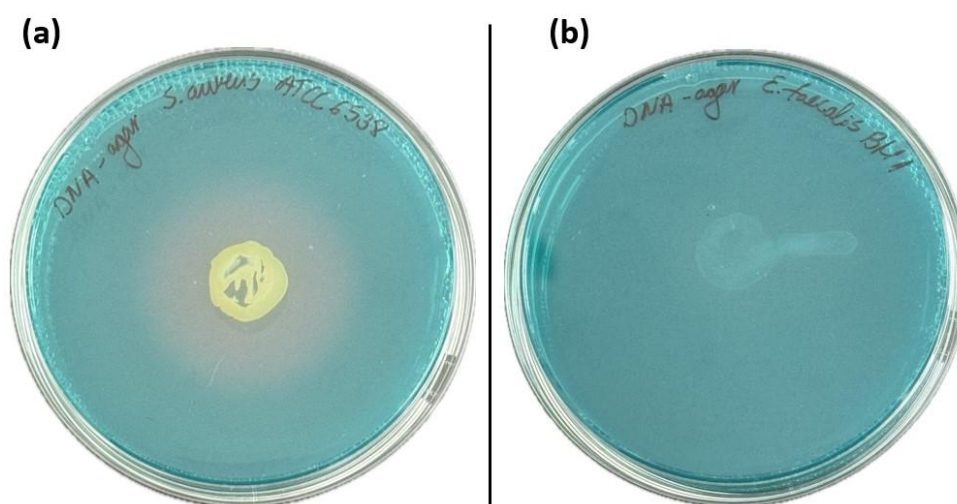
В литературата, експресията на желатиназа е описана като зависи от клетъчната плътност в популацията, както и от продуктите от експресията на *fsr* оперона. Lopes et al. (2006) описват желатиназна активност в 90% от тестваните ентерококи произхождащи от млечни продукти (овче сурово мляко и сирене). В същото проучване обаче е определена желатиназната активност на изолатите след продължителен период на съхранение (една година) в минусови

температури (-80°C). В него е установено загуба на желатиназна активност на 90% от желатиназо-положителните изолати. След изследване на геномните секвенции на изолатите, е открита загуба на гени от *fsr* оперона. В нашето проучване, при някои от фенотипно желатиназо-отрицателни изолати, но *gelE* положителни, също е открита такава зависимост. Тъй като изследваните храни в настоящото проучване, както и изолираните чисти култури, са съхранявани в хладилник (4°C и -20°C, съответно) може да се предположи, че тези ентерококови изолати са загубили способността си да експресират екстрацелуларна желатиназа поради настъпили мутации в *fsr* оперона, провокирани от ниските температури на съхранение. Тези резултати също подсказват за подценяване на присъствието на желатиназо-продуциращи ентерококи в природата, поради влиянието на лабораторните методи за манипулация и изследване на тези видове (тяхното съхранение). В нашето проучване са открити 88% *gelE*-положителни щамове от тестваните ентерококови изолати с човешки произход (кърма). За разлика от тях, при щамовете с хранителен произход присъствието на такива изолати е представено едва в 28% от изследваните популации. Въпреки това, в проучвания на ентерококови популации с човешки произход (от здрави и болни индивиди), не е открита положителна корелация между присъствието на желатиназо-продуциращи ентерококи или наличието на пълния регулаторен *fsr* локус между щамове, причиняващи ентерококови инфекции и такива налични при здрави индивиди (Roberts et al., 2004). В научната литература, както и в това изследване, желатиназо-положителни ентерококи са откривани предимно сред представителите на видовете *E. faecalis* и *E. faecium* (Lopes et al., 2006). Съществуват и проучвания, които описват присъствието на такива генетични детерминанти и фенотипна експресия в представители на видовете *E. durans*, *E. hirae*, и *Enterococcus dispar* (Lopes et al., 2006). В нашето проучване не са открити изолати с такива фенотипни и генотипни признаци за щамовете от вида *E. durans* (n=5), а представители на видовете *E. hirae* и *E. dispar* не са изолирани в настоящата разработка.

4. Наличие на *nuc1* ген и експресия на нуклеазна активност

Нуклеазите се считат за важен фактор във вирулентния потенциал на бактериите, както и за уникален маркер, широко използван при детекцията на някои бактериални видове в храни и клинични изолати (Sandel & McKillip, 2004; Alarcon et al., 2006). Нуклеазите са екзоензими, които могат да хидролизират ДНК и РНК в клетките на гостоприемниците, което води до

разрушаване на тъканите и разпространение на съответния патоген (Sandel & McKillip, 2004; Foster, 2005). От всички анализирани ентерококови изолати, 19,4% (n=14) показват положителна амплификация за наличието на ген за извънклетъчна нуклеаза (*nuc1*). Всички *nuc1*-положителни щамове са представители на вида *E. faecalis* и са изолирани от майчина кърма. Въпреки детектираните гени за екстрацелуларна нуклеаза, нито един от щамовете не показва фенотипна експресия (**Фигура 20**). Поради тази причина, след целогеномно секвениране на един от *nuc1*-положителните щамове (*E. faecalis* BM5), е направена проверка за присъствието на този ген в генома. Генът *nuc1* е открит в хромозомата на щам *E. faecalis* BM5.



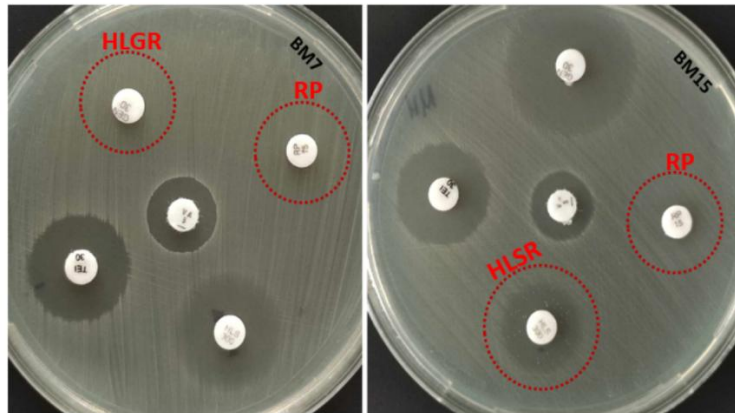
Фиг. 11: (a) Положителна контрола за ДНК-азна активност на типова култура на *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538); (b) Фенотипна ДНК-азна активност на изолат от кърма (*E. faecalis* BM1)

Тези резултати съответстват с изследвания в научната литература, които описват наличието на *nuc1* гена в различни стафилококови видове, но отсъствие на фенотипна нуклеазна активност (Sahaki et al. 2007). В същото проучване са описани филогенетични различия на тези неекспресиращи се гени, сравнени с такива, които се експресират. Авторите на това проучване предполагат различен еволюционен път на гена при тези видове. В тази връзка е възможно наличието на гени за нуклеаза в изследваните ентерококови видове да е придобило друга функция или транспортът на нуклеазата извън клетката да е нарушен.

5. Фенотипна антибиотична резистентност

Фенотипната антибиотична резистентност на изследваните ентерококи е определена съгласно процедурата на EUCAST. В това изследване всички изолати са чувствителни към флуорохинолонови антибиотици (ципрофлоксацин, левофлоксацин и норфлоксацин), тейкопланин, линезолид, нитрофурантоин, ванкомицин и имепенем. Резистентност към ампицилин се наблюдава в 21% (n=15) от всички тествани щамове (Таблица 8). От тях 52% са представители на вида *E. faecalis*, изолирани от майчина кърма.

Резистентност към високи концентрации на гентамицин, високи концентрации на стрептомицин и към хинупристин-далфопристин е открита при два изолата от човешки произход (кърма) (Фигура 21).



Фиг. 12: Тест за фенотипна антибиотична резистентност. Червените кръгове индикират HLGR (резистентност към високи концентрации на гентамицин) и RP (хинупристин-далфопристин) резистентност на изолат *E. faecalis* BM7 и HLSR- резистентност към високи концентрации на стрептомицин (наличие на колонии в зоната на инхибиране) и RP резистентност на *E. faecalis* BM15.

Фенотипният анализ за тетрациклиновата резистентност показва голяма вариабилност в инхибиторните зони: от 13 mm до 50 mm. Според CLSI стандартите, 16 (25%) от всички тествани щамове показват резистентност към тетрациклин и формират зони ≤ 14 mm. По-голямата част от тези щамове принадлежат към вида *E. faecalis* и са изолирани от майчино мляко или прясно краве сирене. Единични представители на *E. gallinarum* (BY17), *Enterococcus* sp. (BY8), *E. casseliflavus* (BY9) и *E. pseudoavium* (CA9), изолирани съответно от българско кисело мляко и ГИТ на *C. aspersum*, също са резистентни към тетрациклин. Щамовете с интермедиерна чувствителност са 8% (n = 6), докато 70% са чувствителни (n = 50).

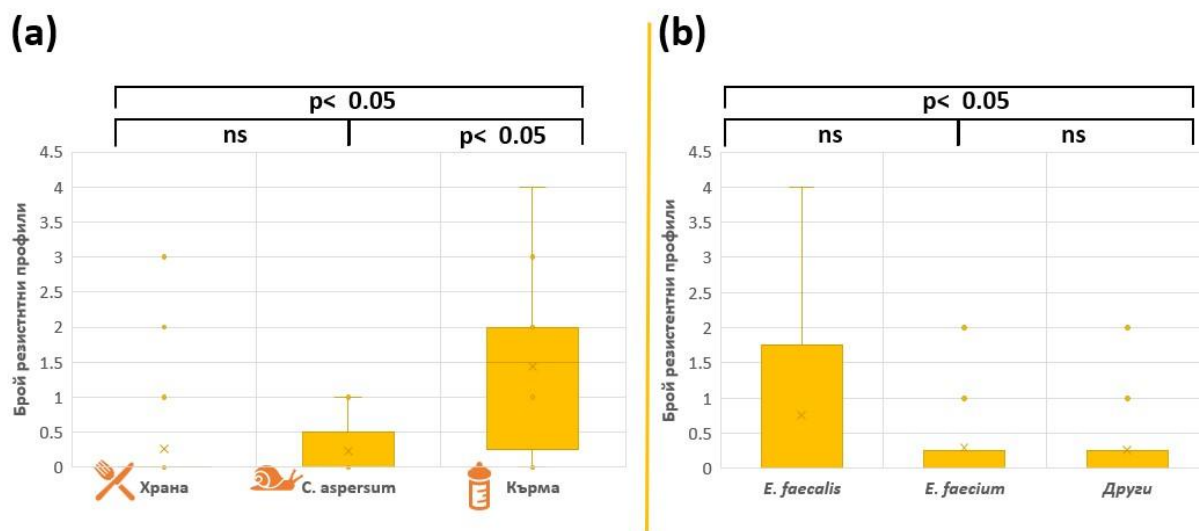
Два щамове показват фенотипен профил на антибиотична мултирезистентност (3% от всички тествани щамове). И двата щамове са представители на вида *E. faecalis*. От тях един проявява резистентност към 4 антибиотика- *E. faecalis* BM15 (AMP-HLSR-RP-TCN). Другият притежава мултирезистентен профил към три антибиотика- *E. faecalis* BM7 (HLGR-RP-TCN). Отчетено е и наличието на още един щам, който притежава резистентност към три антибиотика- *E. faecalis* YFC1 (AMP-TG-TCN), но той не може да бъде класифициран като мултирезистентен, тъй като по дефиниция, мултирезистентни се дефинират щамове, които притежават резистентни профили към повече от две групи антибиотици. В този случай, тетрациклина (TCN) и тигециклина (TG) са представители на една и съща група антибиотици - тетрациклини. Фенотипна резистентност към два антибиотика се наблюдава при 11% от всички тествани щамове (n=8). От тях 75% (n=6) отново са представители на вида *E. faecalis* и са изолирани от майчина кърма: BM3 (AMP-TCN), BM4 (AMP-TCN), BM5 (AMP-TCN), BM9 (AMP-TCN), BM12 (AMP-TCN) и BM14 (AMP-TCN). Останалите два щамове, *E. faecium* CM1 (AMP-ERV) и *E. gallinarum* BY17 (AMP-TCN), са изолирани съответно от храна и от интестиналния тракт на охлюв.

Табл. 5: Разпределение на фенотипната антибиотична резистентност сред ентерококовите изолати.

Резистентен към антибиотици фенотип	Брой изолати	Видова идентификация	Източник на изолиране
Един антибиотик			
AMP	5	<i>E. faecium</i> DK1	Дюнер
		<i>E. mundtii</i> CA1	<i>C. aspersum</i>
		<i>E. malodoratus</i> CA11	
		<i>E. devriesei</i> CA13	
TCN	3	<i>E. faecalis</i> BM6	Кърма
		<i>E. pseudoavium</i> CA9	<i>C. aspersum</i>
		<i>E.sp.</i> BY8	Кисело мляко
<i>E. casseliflavus</i> BY9			
Два антибиотика			
AMP + ERV	1	<i>E. faecium</i> CM1	Краве мляко
AMP+TCN	7	<i>E. faecalis</i> BM3	Кърма
		<i>E. faecalis</i> BM4	
		<i>E. faecalis</i> BM5	
		<i>E. faecalis</i> BM9	
		<i>E. faecalis</i> BM12	
		<i>E. faecalis</i> BM14	
		<i>E. gallinarum</i> BY17	Кисело мляко
Три антибиотика			
GEN + RP+TCN	1	<i>E. faecalis</i> BM7	Кърма
AMP + TG+TCN	1	<i>E. faecalis</i> YFC1	Прясно краве сирене
Четири антибиотика			
AMP + HLS + RP+TCN	1	<i>E. faecalis</i> BM15	Кърма

Въпреки това, статистическият анализ показва, че няма значими статистически различия в броя на резистентните профили между *E. faecalis* и *E. faecium* ($p > 0.05$), както и между *E. faecium* и други ентерококи, различни от *E. faecalis* ($p > 0.05$). Забелязват се обаче значими статистически различия между *E. faecalis* и други ентерококи, различни от *E. faecium* ($p < 0.05$)

(Фигура 22b). Човешките изолати (от кърма) показват резистентност към повече антибиотици в сравнение с другите две групи (изолати от храни и охлюв). Установени са значителни различия между профилите на антибиотична резистентност между щамове от храни и кърма ($p < 0.05$), както и между щамове от охлюв и кърма ($p < 0.05$). Не са открити значими статистически различия между щамове, изолирани от храни и охлюв ($p > 0.05$) (Фигура 22a).



Фиг. 13: Статистически анализ за разпределението на резистентните профили (a) сред различните ентерококови видове и (b) сред изолати с различен произход. За значителни статистически различия се считат $p < 0.05$. ns отговаря на незначителни статистически различия (non-significant).

Нашата основна хипотеза е, че преминавайки през гостоприемници от различни царства, ентерококите успешно се адаптират към настоящия хабитат, придобивайки различни гени за антибиотична резистентност и спомагайки за вътревидовите взаимоотношения. Поради тази причина е наложително да бъде изследвана подробно антибиотичната резистентност на ентерококи, произхождащи от различни екологични ниши. Тези знания могат да бъдат полезни при оценяването на потенциалния риск от нежелан генетичен товар след повторно връщане на ентерококите (с придобит потенциал за антибиотична резистентност) в околната среда.

Нашите резултати показват, че потенциално растително-асоциираните изолати в ГИТ на охлюва и в храните (*E. mundtii* CA1, *E. malodoratus* CA11 и *E. devriesei* CA13) са резистентни към ампицилин. Въпреки това, друго проучване посочва, че ентерококи, изолирани от сурови и обработени храни, имат различни фенотипни и молекулни профили на антибиотична резистентност (Chajęska-Wierzchowska et al., 2021). Авторите на това проучване откриват, че

щамове на *E. faecium*, *E. faecalis* и *E. casseliflavus* са резистентни към еритромицин, стрептомицин, тигециклин, фосфомицин и римфапицин, но не и към ампицилин. В същото проучване е открита положителна корелация между фенотипна антибиотична резистентност към високи концентрации на аминогликозиди и съответните им генетични детерминанти (*ant(6')-Ia*, *aph(3')-IIIa* и *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*) (Chajęcka-Wierzchowska et al., 2021).

Проведените в това изследване анализи показват, че мултирезистентни на антибиотици ентерококи се откриват единствено в изолати от човешки произход (кърма). Въпреки това, в литературата са описани мултирезистентни на антибиотици щамове и в млечни продукти (Gołaś-Prądyńska et al., 2022). В нашето проучване се забелязват значителни различия в броя на резистентните на антибиотици щамове от човешки произход, за разлика от останалите изолати. Това може да се обясни с факта, че употребата на антибиотици при хората е по-интензивна и разнообразна отколкото в селското стопанство. Освен това, болничните условия създават идеална среда за разпространение на мултирезистентни бактерии поради големия брой на пациенти с потисната имунна система и честата употреба на широкоспектърни антибиотици (Founou et al., 2016).

6. Скрининг за гени за антибиотична резистентност

Гените за антибиотична резистентност са разпространени в повече от половината от анализираниите щамове. Изолатите, показващи наличие на един или на повече от един ген за антибиотична резистентност, представляват 54% (n=39) от изследваната ентерококова популация.

Гените за тетрациклинова резистентност са най-разпространени сред ентерококовите популации като от 7 анализирани гена, детерминиращи тетрациклинова резистентност (*tetM*, *tetK*, *tetL*, *tetO*, *tetS*, *tetW* и *tetT*), положителни амплификационни продукти са получени само при 4 от тях (*tetM*, *tetO*, *tetS* и *tetT*) в 38% (n=27) от всички тествани щамове. Генът *tetM* е най-често срещан сред анализираниите ентерококови популации (31%; n=22). Гените *tetS*, *tetO* и *tetT* са по-слабо разпространени: 7% (n=5; *E. faecalis* щамове YFC3 и BM15, *E. pallens* щам CA10 и *E. devriesei* щамове CA13 и CA16), 3% (n=2; *E. durans* щам YFC5 и *E. malodoratus* щам CA11) и 1% (n=1; *E. gallinarum* щам CA15), респективно. В анализираниите популации не са детектирани щамове, съдържащи гените *tetK*, *tetL* и *tetW* (Таблица 9).

Табл. 6: Сравнение на генотипните и фенотипни профили за тетрациклинова резистентност на ентерококи с неклиничен произход

Наличие на <i>tet</i> гени	Брой щамове (n), %	Щамове	Произход	Зона на инхибиране (mm)	CLSI интерпретация	
<i>tetM</i>	(n=22), 31%	<i>E. gallinarum</i> BY17	Кисело мляко	14	R	
		<i>E. faecium</i> CM1	Прясно краве мляко	19	S	
		<i>E. faecalis</i> CM4		15	I	
		<i>E. faecalis</i> YFC1	Прясно краве сирене	14	R	
		<i>E. faecalis</i> YFC3		28	S	
		<i>E. pseudoavium</i> CA9	<i>Cornu aspersum</i>	14	R	
		<i>E. pallens</i> CA10		16	I	
		<i>E. faecalis</i> BM2	Кърма	25	S	
		<i>E. faecalis</i> BM3 - BM9		14	R	
		<i>E. faecalis</i> BM14-BM16			13	R
		<i>E. faecalis</i> BM11, BM12		16		I
		<i>E. faecalis</i> BM10, BM13				
<i>tetS</i>	(n=6), 8%	<i>E. faecalis</i> YFC3	Прясно краве сирене	28	S	
		<i>E. pallens</i> CA10	<i>Cornu aspersum</i>	16	I	
		<i>E. devriesei</i> CA13		49	S	
		<i>E. devriesei</i> CA16		17	I	
		<i>E. faecalis</i> BM15	Кърма	14	R	
<i>tetO</i>	(n=2), 3%	<i>E. durans</i> YFC5	Прясно краве сирене	32	S	
		<i>E. malodoratus</i> CA11	<i>Cornu aspersum</i>	50	S	
<i>tetT</i>	(n=1), 1%	<i>E. gallinarum</i> CA15	<i>Cornu aspersum</i>	35	S	
<i>tetM+tetS</i>	(n=3), 4%	<i>E. pallens</i> CA10	<i>Cornu aspersum</i>	16	I	
		<i>E. faecalis</i> BM15	Кърма	14	R	
		<i>E. faecalis</i> YFC3	Прясно краве сирене	28	S	

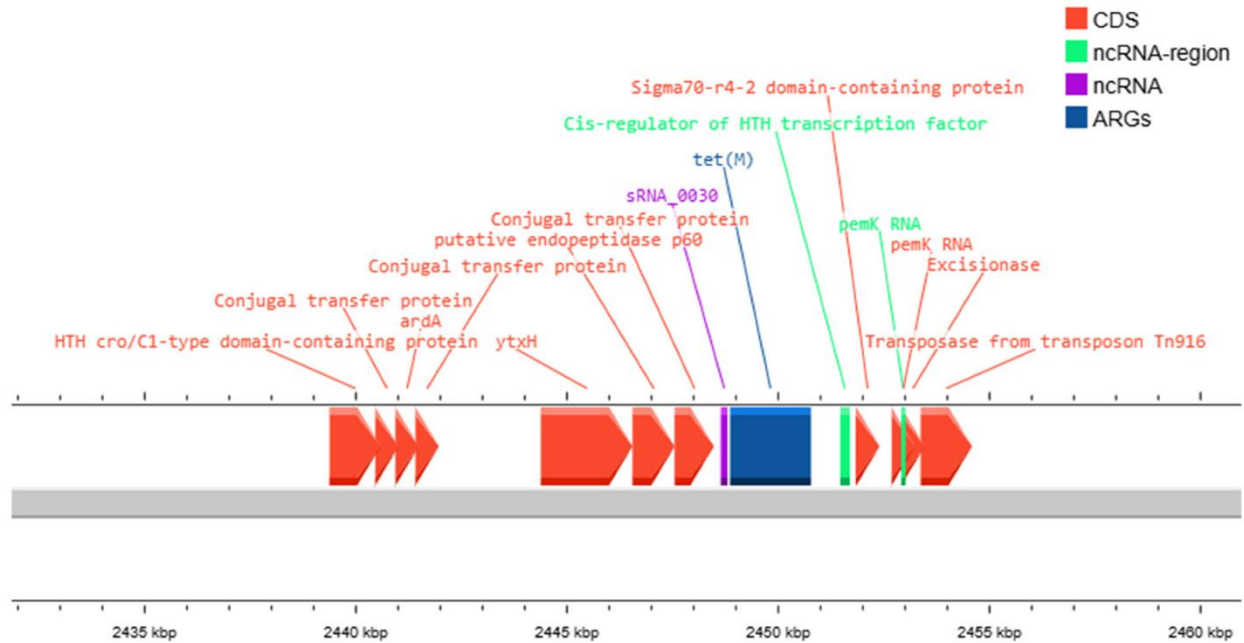
Сравнението на положителните PCR амплификации за *tet* гени и големината на зоната на инхибиране показва, че *tetT* положителният щам (CA15) формира инхибиторна зона от 35mm. Двата *tetO* положителни щама (YFC5 и CA11) дават зони с големина съответно 35 mm и 50 mm. Повечето от щамове с фенотипна тетрациклинова резистентност съдържат предимно *tetM* гени (n =14). В три щама (*E. faecalis* YFC3, *E. pallens* CA10 и *E. faecalis* BM15) е открита комбинацията от *tetM* и *tetS* гените. Два от тези щама (YFC3 и CA10) показват респективно силна и интермедиерна чувствителност.

Мониторингът за разпространението на *tet* гените сред изолатите с различен произход показва, че изолатите с най-много гени за тетрациклинова резистентност са именно тези от кърма ($n = 14$), последвани от изолатите от ГИТ на *C. aspersum* ($n = 5$) и прясно краве сирене ($n = 3$). Храната с най-малък брой *tet*-положителни щамове е българското кисело мляко (0 от всички 27 щам). Не са открити гени за тетрациклинова резистентност в изолати, принадлежащи на видовете *E. gilvus*, *E. casseliflavus* и *E. mundtii*.

Статистическият анализ показва значителни различия между броя на гените за тетрациклинова резистентност в *E. faecalis* и видове, различни от *E. faecalis* ($p < 0.05$). Не са открити значителни различия между броя на гените за тетрациклинова резистентност в изолатите от храни и охлюв ($p > 0.05$). Въпреки това, различията са значителни между изолати от храни и кърма ($p < 0.05$), както и между изолати от охлюв и кърма ($p < 0.05$).

Анотация на геномите на четири от изследваните *E. faecalis* щамове (CM4, BM5, BM12 и BM15) чрез CARD (Comprehensive Antibiotic Resistance Database) в Proksee, потвърждава получените чрез PCR резултати - всички изолати съдържат *tet* гени в геномите си. Както индикират PCR резултатите, щамовете CM4, BM5 и BM12 съдържат само *tetM* гени в геномите си. Щам BM15, както е детектирано и чрез PCR, притежава два гена за тетрациклинова резистентност- *tetM* и *tetS*. Още повече, локализацията на *tetM* в геномите на анализирани изолати е в близост до Tn916 транспозаза. Чрез MobileElementFinder софтуера е детектирано и анализирано разположението на *tetM* гените в близост до Tn6009 мобилни генетични елементи (Фигура 23; Таблица 10). Този транспозон е част от Tn916 семейството и досега е описван в литературата като свързан с *tetM* гените (Soge et al., 2008).

Анализите в тази дисертация показват разпространението на гени за тетрациклинова резистентност сред анализирани ентерококови популации, като 38% от тях показват амплификационни продукти за *tet* гени. Тези данни съответстват с други анализи, осъществени на територията на България. Анализи за антибиотичната резистентност на ентерококи от отпадни води в България, публикувани през 2024 г., показват подобно разпределение. Те описват повече от 35% от анализирани щамове като резистентни на тетрациклин (Tsvetanova et al., 2025). Друго проучване в България разглежда разпространението на тетрациклинова резистентност в клинични изолати, при които резистентните на тетрациклин изолати наброяват 69% от анализирани (Popova et al., 2013).



Фиг. 14: Локализация на *tetM* гена в близост до транспозонни елементи. В тази аотирана ДНК секвенция може да се види гена за транспозаза на Tn916. Изображението е генерирано чрез Map Builder в Proksee 2.0.5.

Табл. 7: Мобилни генетични елементи в секвенираните щамове и връзката им с *tetM* гена

Изолат	Мобилен елемент	Номер в базата данни	Позиция	<i>tetM</i> позиция
CM4	Tn6009	EU399632	Хромозома: 2761729-2763617	Хромозома: 2765545-2767464
BM5			Хромозома: 2835546-2837434	Хромозома: 2831695-2833614
BM12			Хромозома: 536173-538061	Хромозома: 539989-541909
BM15			Хромозома: 2452706-2454594	Хромозома: 2448860-2450779

В глобален мащаб тетрациклиновата резистентност на ентерококите се увеличава значително през годините (Guan et al., 2024), което още веднъж подчертава важноста за проследяване на тази резистентност в бактериалните популации.

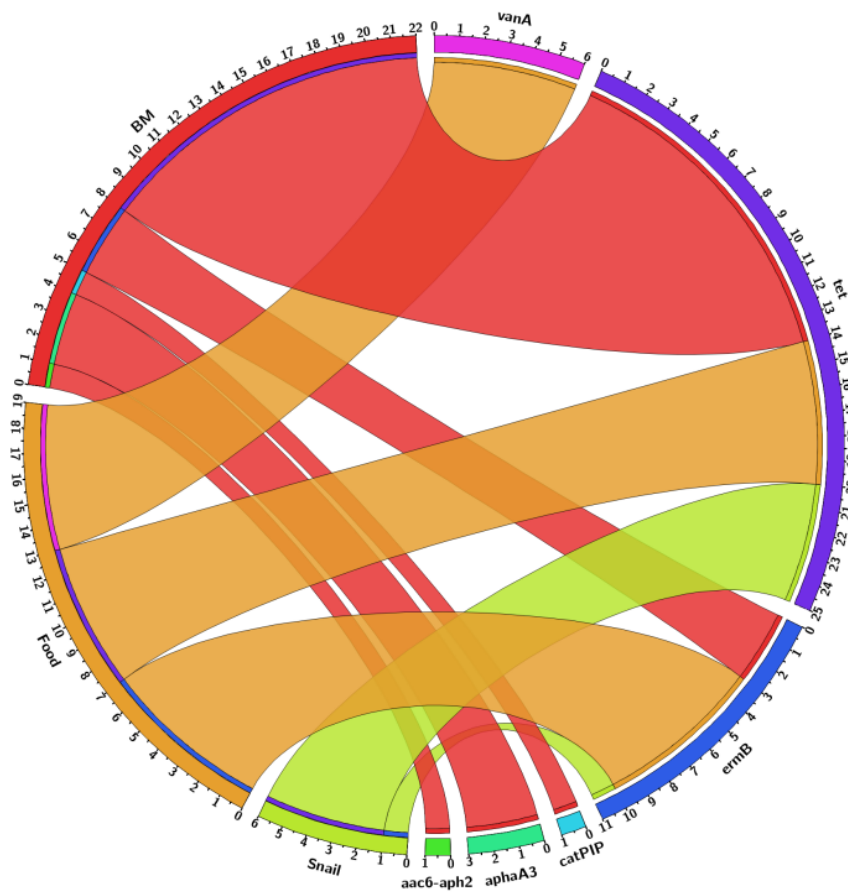
Значителен брой гени за тетрациклинова резистентност са вече описвани като доминантни в клинични ентерококови изолати, дори в ранните години на употребата на тетрациклина (Huys et al., 2004). В нашето проучване доминантен ген за тетрациклинова резистентност е *tetM*, подобно на други ентерококови популации изолирани от различни екологични ниши (Tsvetanova et al., 2025, Gołaś-Prączyńska et al., 2022, Pärnänen et al., 2018). Установеното силно присъствие на *tetM* гени в изолатите от кърма (в 94% от щамовете) предполага и ролята му в интестиналния резистом на новородените. Подобни предположения за споделен резистом и мобилни генетични елементи във фецес на новородени и кърма на техните майки, са докладвани в литературата (Pärnänen et al., 2018). Други изследвания предполагат вагинален произход на *tetM* гените в новородените (Alicea-Serrano et al., 2013). Тези данни предполагат, че гените за антибиотична резистентност в микробиотата на новородените могат да попаднат по различни пътища - чрез храната и по време на родилния процес. Това може да обясни широкото разпространение на тетрациклиновата резистентност при бозайниците, започвайки от раждането и продължавайки чрез храненето, както като новородени, така и като възрастни индивиди чрез хранителните им източници.

Прави впечатление, че наличието на *tet* гени в настоящото проучване е сравнително ниско в ентерококовите видове, изолирани от храни (кисело мляко, краве прясно мляко и сирена). Тези резултати не са подкрепени от други, публикувани в научната литература (Gołaś-Prączyńska et al., 2022). Само 6 от 39 (15%), от нашите неклинични щамове, изолирани от български храни, притежават гени за тетрациклинова резистентност. Изследване на различни белгийски храни показва, че неклинични изолати на *E. faecalis* (71%), *E. faecium* (6.6%), *E. durans* (15%) и *E. gallinarum* (2.2%) съдържат *tetM* гени в генома си (Huys et al., 2004). В литературата *E. faecalis* е описван като видът, който най-често носи гени за тетрациклинова резистентност (Martinez-Laorden et al., 2023). В нашето проучване не се откриват *tet* гени в щамове от видовете *E. casseliflavus*, *E. gilvus* и *E. mundtii*, подобно на други проучвания (Huys et al., 2004). Въпреки че е слабо описано, някои автори споменават липсата на *tet* гени в *E. casseliflavus* или неспособност за генната им експресия, докато други автори описват обратното

(Ayeni et al., 2016, Macovei et al., 2006). Сравнението между PCR амплификациите на *tet* гените и големината на зоните на инхибиране, показва че не всички *tet* гени (*tetT* и *tetO*) са функционално активни. Зоните на инхибиране показват, че щамовете, съдържащи тези гени са чувствителни към тетрациклин, което води до предположението, че тези гени не се експресират при тестваните условия.

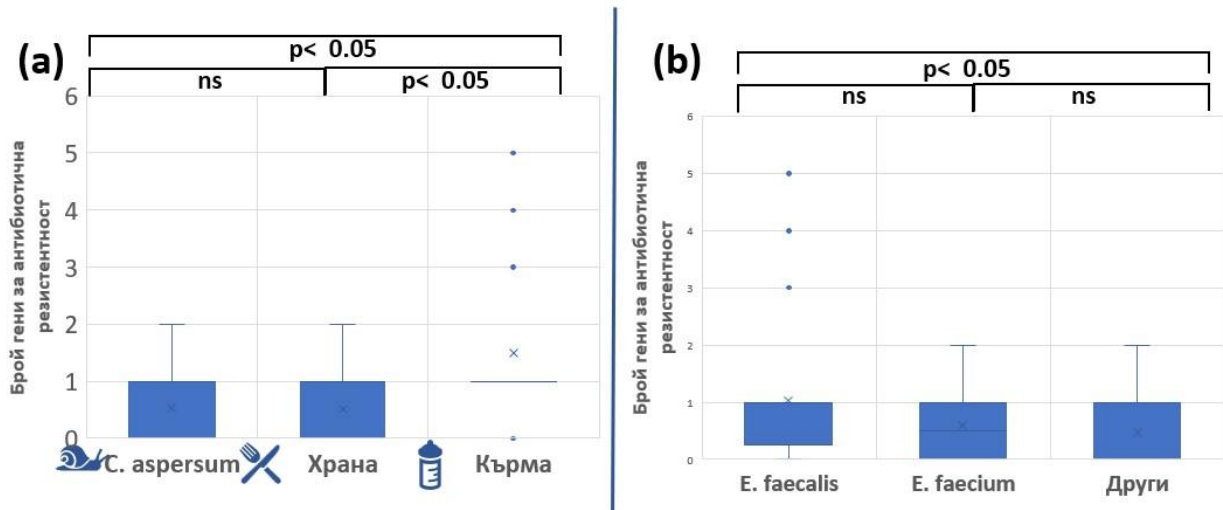
Генът *ermB*, асоцииран с макролидна резистентност, е слабо разпространен (15%) сред анализирания ентерококова популация, следван от *vanA* (8%), *aphA3* (4%), *aac6'-aph2"* (1%) и *catpIP501* (1%). От анализиранияте популации 5 щамове (*E. faecium* MFC1, *E. faecalis* BM7, *E. faecalis* BM8 и *E. faecalis* BM15) амплифицират фрагменти за повече от един ген за антибиотична резистентност (съответно *ermB-vanA*; *ermB-aphA3-HLG-tetM*); *ermB-aphA3-tetM*; *ermB- catpIP501-aphA3-tetM-tetS*). Тези резултати показват положителна корелация между генотипна и фенотипна антибиотична резистентност към макролидни антибиотици. Въпреки това, другият ген, отговорен за макролидна антибиотична резистентност (*mefA*) не е детектиран. Неочаквано, генът *vanA*, асоцииран с ванкомицинова резистентност, се открива само в 6 от всички тествани щамове: пет щамове *E. faecalis*, изолирани от кисело мляко (BY2, BY3, BY4, BY5, BY6) и един щам *E. faecium*, изолиран от зряло козе сирене (MFC1). Независимо от установената генетична обусловеност на тази резистентност, не е наблюдавана фенотипна експресия.

Само един щам (BM7), съдържащ ген за антибиотична резистентност към високи концентрации на гентамицин (*aac6'-aph2*), показва съответната фенотипна резистентност към 30 µg/disc гентамицин. Петнадесет от изолатите (20%) показват фенотипна резистентност към ампицилин, но нито един от щамовете няма *blaZ* гена (кодиращ β-лактамази) в генома си. Генът *gyrA* също липсва и резистентност към флуорохинолоните (ципрофлоксацин, норфлоксацин и левофлоксацин) не се наблюдава.



Фиг. 15: Разпространение на гени за антибиотична резистентност в ентерококи от храни (food), охлюв (snail) и кърма (BM). Изображението е генерирано в Circos Table Viewer v0.63-10. Външния кръг на диаграмата представя броя на изолатите, носещи анализираният ген. Ако gena е детектиран в изолати от съответния произход са показани свързващи линии между специфичните гени и произхода на изолатите

Видовите сравнения не показват значителни статистически различия в броя на гените за антибиотична резистентност между *E. faecalis* и *E. faecium* ($p > 0.05$), както и между *E. faecium* и други ентерококови видове ($p > 0.05$), но значителни статистически различия могат да бъдат наблюдавани между изолати на *E. faecalis* и други ентерококови видове ($p < 0.05$) (**Фигура 25 b**). От друга страна, сравнението на произхода на изолатите показва значителни различия в броя на гените за антибиотична резистентност между изолатите от охлюв и кърма ($p < 0.05$), както и между кърма и храни ($p < 0.05$). Статистически различия не са наблюдавани между изолати от храни и охлюв ($p > 0.05$) (**Фигура 25 a**).



Фиг. 16: Сравнение на броя на гените за антибиотична резистентност между изолати с различен произход (a) и между различни ентерококови видове (b).

При биоинформатичния анализ на 4-те целогеномно секвенирани щама (*E. faecalis* CM4, VM5, VM12, VM15) са открити допълнителни гени за придобита антибиотична резистентност извън изследваните чрез PCR амплификация. И в четирите щама е детектиран генът *lsaA*, определящ комбинирана резистентност към линкозамид и стрептрограмин А (и понякога плевомутилин), така наречения LS_A (или LS_{AP}) фенотип (Sharkey et al. 2016). В литературата е описан ABC-F белтък, кодиран от този ген, който вероятно изпълнява рибозомална протективна функция, аналогична на *tetM* и *tetO* гените (Wilson et al., 2016). Нещо повече, продуктът, детерминиран от *lsaA* гена, е описван като зависим от концентрацията на антибиотика (Sharkey et al. 2016). Във всички секвенирани щамове е детектиран още генът *dfpE*, определящ резистентност към високи нива на триметоприм. Фенотипна проява на такава резистентност обаче не са открити в нашата разработка.

В това проучване се откриват някои несъответствия между наличието на гени за антибиотична резистентност и тяхната фенотипна проява. Това несъответствие може да бъде отдадено на мутации в гените или техните промотърни участъци, водещи до невъзможност за експресия или до синтезиране на нефункционални продукти. Условието, в които се намират щамовете, също могат да бъдат предпоставка за индуциране на биосинтезата на съответните продукти на гените.

Резултатите в тази дисертация показват, че наличието на гени за антибиотична резистентност е най-голямо в ентерококовите популации, изолирани от кърма (**Фигура 24**). Някои автори определят възможността за придобиване на гени за антибиотична резистентност като признак, зависим от щамовата специфичност на ентерококите, имайки предвид екологичната ниша, която те обитават (Mannu et al., 2003, Franz et al., 2001). Статистическият анализ в нашите резултати показва, че разпространението на гените за антибиотична резистентност е значително по-голямо в щамове от вида *E. faecalis* и е зависимо от екологичните ниши, които обитават ентерококите (**Фигура 25**).

IV. Генетични детерминанти, участващи в хоризонталния генен трансфер (ХГТ)

1. Агрегационни вещества

Изолатите са тествани за наличието на 4 гена за агрегационни вещества - *agg*, *asa1*, *prgB* и *asa373*. Положителни амплификации се наблюдават при 39% (n=28) от всички тествани изолати (**Таблица 11**).

Табл. 8: Разпределение на гени отговорни за ХГТ в изолати на ентерококи с неклиничен произход

Щам	Гени отговорни за ХГТ										Щам	Гени отговорни за ХГТ									
	<i>cpd</i>	<i>cob</i>	<i>cef</i>	<i>prgW</i>	<i>Int-in</i>	<i>asaI</i>	<i>prgB</i>	<i>asa37</i>	<i>agg</i>	<i>cpd</i>		<i>cob</i>	<i>cef</i>	<i>prgW</i>	<i>Int-in</i>	<i>asaI</i>	<i>prgB</i>	<i>asa37</i>	<i>agg</i>		
<i>E. faecium</i> CM1											<i>E. faecalis</i> BY25										
<i>E. durans</i> CM2											<i>E. faecalis</i> BY26										
<i>E. durans</i> CM3											<i>E. faecalis</i> BY27										
<i>E. faecalis</i> CM4											<i>E. mundtii</i> CA1										
<i>E. faecalis</i> YFC1											<i>E. casseliflavus</i> CA2										
<i>E. durans</i> YFC2											<i>E. gilvus</i> CA3										
<i>E. faecalis</i> YFC3											<i>E. mundtii</i> CA4										
<i>E. durans</i> YFC4											<i>E. casseliflavus</i> CA5										
<i>E. durans</i> YFC5											<i>E. mundtii</i> CA6										
<i>E. faecium</i> MFC1											<i>E. mundtii</i> CA7										
<i>E. faecium</i> MFC2											<i>E. mundtii</i> CA8										
<i>E. faecium</i> DK1											<i>E. pseudoavium</i> CA9										
<i>E. faecium</i> BY1											<i>E. pallens</i> CA10										
<i>E. faecalis</i> BY2											<i>E. maloduratus</i> CA11										
<i>E. faecalis</i> BY3											<i>E. casseliflavus</i> CA12										
<i>E. faecalis</i> BY4											<i>E. devriesei</i> CA13										
<i>E. faecalis</i> BY5											<i>E. gallinarum</i> CA14										
<i>E. faecalis</i> BY6											<i>E. gallinarum</i> CA15										
<i>E. species</i> BY7											<i>E. devriesei</i> CA16										
<i>E. species</i> BY8											<i>E. mundtii</i> CA17										
<i>E. casseliflavus</i> BY9											<i>E. faecalis</i> BM1										
<i>E. faecalis</i> BY10											<i>E. faecalis</i> BM2										
<i>E. faecalis</i> BY11											<i>E. faecalis</i> BM3										
<i>E. faecium</i> BY12											<i>E. faecalis</i> BM4										
<i>E. faecium</i> BY13											<i>E. faecalis</i> BM5										
<i>E. faecium</i> BY14											<i>E. faecalis</i> BM6										
<i>E. faecium</i> BY15											<i>E. faecalis</i> BM7										
<i>E. faecium</i> BY16											<i>E. faecalis</i> BM8										
<i>E. gallinarum</i> BY17											<i>E. faecalis</i> BM9										
<i>E. casseliflavus</i> BY18											<i>E. faecalis</i> BM10										
<i>E. casseliflavus</i> BY19											<i>E. faecalis</i> BM11										
<i>E. casseliflavus</i> BY20											<i>E. faecalis</i> BM12										
<i>E. casseliflavus</i> BY21											<i>E. faecalis</i> BM13										
<i>E. faecalis</i> BY22											<i>E. faecalis</i> BM14										
<i>E. faecalis</i> BY23											<i>E. faecalis</i> BM15										
<i>E. faecalis</i> BY24											<i>E. faecalis</i> BM16										

С розов цвят- отрицателен резултат, не се наблюдава амплификационен продукт; зелен цвят- положителен резултат, наличие на специфичен амплификационен продукт.

От тях, 71% (n=20) принадлежат към вида *E. faecalis*. Останалите осем щамове са идентифицирани като *E. faecium* (n=6; CM1 и BY12-BY16), *E. devriesei* (n=1; CA13) и *E. mundtii* (n=1; CA8). Положителни амплификации се наблюдават при два щамове изолирани от интестиналния тракт на охлюв (*E. mundtii* CA8 и *E. devriesei* CA13), 14 щамове от кърма и 12 щамове от храна. Генът *prgB* е най-често амплифициран сред тестваните щамове (75% от всички положителни изолати, n=21), последван от *asa1* със 68% (n=19), *agg* с 39% (n=11) и *asa373* с 4% (n=1; *E. faecalis* BY11). Статистическият анализ не показва значителни различия в броя на гените за агрегационни вещества между изолатите от храна и охлюв ($p > 0.05$). От друга страна, са открити значителни статистически различия между изолатите от храна и кърма и между изолатите от охлюв и кърма ($p < 0.05$). Анализът показва и значителни различия в броя на гените за агрегационни вещества между щамове на *E. faecalis* и други видове ($p < 0.05$).

2. Полови феромони

Всички анализирани изолати са амплифицирани с праймери за гени за три полови феромона - *cpd*, *cop* и *cff*. Положителни амплификации са детектирани в 76% (n=55) от всички тествани изолати (**Таблица 11**). Преобладаващият ген във всички положителни изолати е *ccf* с 90% (n=50), последван от *cpd* с 65% (n=36) и *cob* с 36% (n=20). Анализираните гени са налични в широк диапазон от видове, но по-голямата част от положителните щамове за полови феромони принадлежат към вида *E. faecalis* (56% от всички положителни изолати, n=31). Въпреки това, сред положителните видове се откриват и представители на видовете *E. faecium* (16%, n=9), *E. durans* (4%, n=2), *Enterococcus sp.* (4%, n=2), *E. casseliflavus* (9%, n=5), *E. gallinarum* (5%, n=3), *E. mundtii* (2%, n=1) и *E. pallens* (2%, n=1). Статистическият анализ също показва значителни различия в броя на гените за полови феромони между *E. faecalis* и другите ентерококови видове ($p < 0.05$).

По отношение на произхода на изолатите, всички изолати от кърма (n=16) и по-голямата част от изолатите от храна (87%, n = 34) са положителни. Само пет щамове (29%) от изолатите от охлюв генерират търсените фрагменти за тези гени. Статистиката показва значителни различия между броя на половите феромони и в трите групи: изолати от храна и охлюв ($p < 0.05$), изолати от храна и кърма ($p < 0.05$) и изолати от кърма и охлюв ($p < 0.05$).

3. Мобилни генетични елементи

Наличието на транспозонното семейство *Tn916–1545* и феромон-индуцируемия плазмид *pCF10* е определено чрез амплифициране на фрагменти от гените *Int-Tn* (интеграционния ген за *Tn916–1545* семейството) и *prgW* (ген кодиращ инициаторния белтък на репликация за *pCF10*) респективно. Получените резултати показват, че 19% (n=14) от всички тествани щамове са положителни за интеграционния ген, докато 22% (n=16) генерират фрагмент за *prgW* (Таблица 11). Всички щамове, носещи тези мобилни генетични елементи са представители на вида *E. faecalis*. По-голямата част от тях са изолати от кърма (81% от всички тествани щамове от кърма, n = 13). Само три щамове (CM4, YFC1 и YFC3) са част от групата от храните. Изолатите от *S. aspersum* не носят гени за мобилни генетични елементи. Повечето от щамовете, които притежават *Tn916–1545* транспозон, носят и *pCF10* в генома си. Изключение са два щамове *E. faecalis* - BM13 (*prgW* (+), *Int-Tn* (-)) и BM14 (*prgW* (-), *Int-Tn* (+)).

След направено целогеномно секвениране на 4 щамове от колекцията (*E. faecalis* CM4, BM2, BM12 и BM15) е открит общ интегративен конюгативен елемент във всички щамове - Tn6009. Този транспозон е описан в тази разработка като свързан с гени за тетрациклинова резистентност (по-конкретно, *tetM*). Детектирани са още и общи композитни транспозони или инсерционни елементи от IS30 семейството (cn_16563_IS1062, cn_35379_IS1062, cn_14260_IS1062) и IS256 семейството (cn_11751_ISLgar5, cn_12027_ISLgar5, cn_11657_ISLgar5). Отличават се и инсерционни елементи, срещани по единично в конкретни щамове. В щам *E. faecalis* CM4 присъства инсерционен елемент от семейство IS3 и група IS150 (ISLIa3). В щам *E. faecalis* се срещат композитен транспозон и инсерционен елемент от IS1380 семейството, а в щам BM12 инсерционен елемент от IS6 семейството (ISS1N).

Тези резултати, както и детектираните плаزمиди, описват представителите на вида *E. faecalis* в тази разработка като притежаващи сравнително голям мобилом. Тези резултати съвпадат с научната литература, като пример за това е *E. faecalis* V587, в който мобилните генетични елементи представляват една четвърт от неговия геном. Те включват три независимо реплициращи се плазмиди, три хромозомно интегрирани плазмидни участъка, седем профага и един остров на патогенност (Shankar et al., 2002; Paulsen et al., 2003). Това, от своя страна може да бъде свързано с преминаването на тези ентерококи от комменсални бактерии към патогени (Willems & van Schaik, 2009). Тези резултати описват и ентерококите с човешки и потенциално

животински произход (от млечни храни) като подложени на най-голям еволюционен натиск, което определя и приема на голям брой мобилни генетични елементи, необходими за тяхното оцеляване и еволюция.

V. CRISPR-локуси и CRISPR-асоциирани белтъци (CAS белтъци).

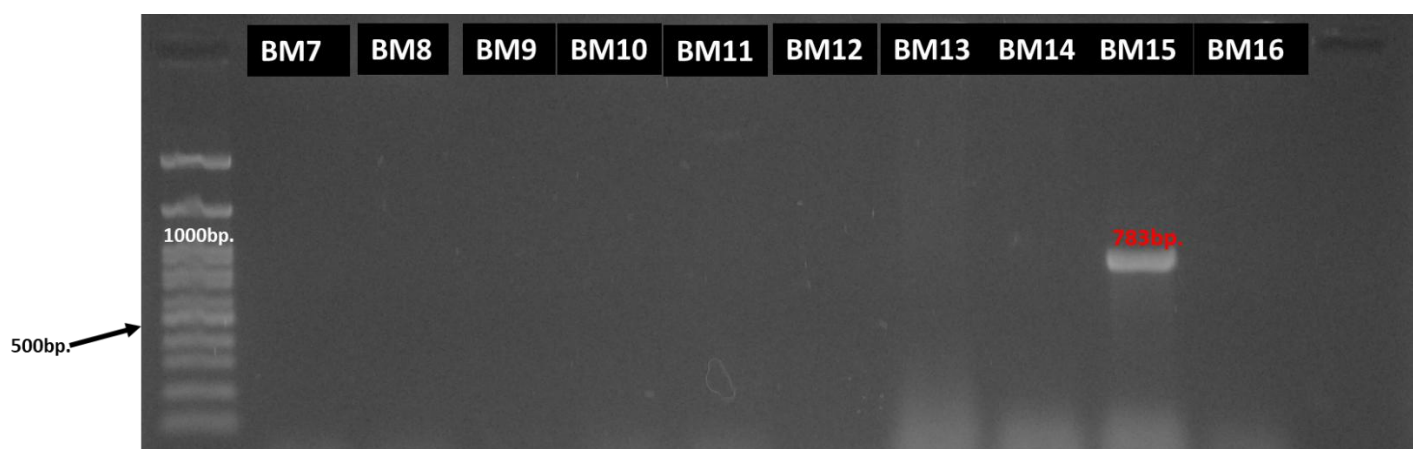
Всички щамове от настоящото изследване са тествани за наличието на CRISPR локуси и техните асоциирани CAS белтъци чрез конвенционален PCR. Наличните резултати показваха, че 42% (n=30) от всички тествани щамове притежават поне един CRISPR локус в техните геноми (**Таблица 12**).

Табл. 9: Разпределение на CRISPR локуси и гени за Cas белтъци в неклинични ентерококови изолати

Щам	CRISPR					Щам	CRISPR				
	CRISPR1-cas	CRISPR1-cas	CRISPR2-loci	CRISPR3-cas	CRISPR3-cas		CRISPR1-cas	CRISPR1-cas	CRISPR2-loci	CRISPR3-cas	CRISPR3-cas
<i>E. faecium</i> CM1						<i>E. faecalis</i> BY25					
<i>E. durans</i> CM2						<i>E. faecalis</i> BY26					
<i>E. durans</i> CM3						<i>E. faecalis</i> BY27					
<i>E. faecalis</i> CM4						<i>E. mundtii</i> CA1					
<i>E. faecalis</i> YFC1						<i>E. casseliflavus</i>					
<i>E. durans</i> YFC2						<i>E. gilvus</i> CA3					
<i>E. faecalis</i> YFC3						<i>E. mundtii</i> CA4					
<i>E. durans</i> YFC4						<i>E. casseliflavus</i>					
<i>E. durans</i> YFC5						<i>E. mundtii</i> CA6					
<i>E. faecium</i> MFC1						<i>E. mundtii</i> CA7					
<i>E. faecium</i> MFC2						<i>E. mundtii</i> CA8					
<i>E. faecium</i> DK1						<i>E. pseudoaerium</i>					
<i>E. faecium</i> BY1						<i>E. pallens</i> CA10					
<i>E. faecalis</i> BY2						<i>E. maloduratus</i>					
<i>E. faecalis</i> BY3						<i>E. casseliflavus</i>					
<i>E. faecalis</i> BY4						<i>E. devriesei</i> CA13					
<i>E. faecalis</i> BY5						<i>E. gallinarum</i>					
<i>E. faecalis</i> BY6						<i>E. gallinarum</i>					
<i>E. species</i> BY7						<i>E. devriesei</i> CA16					
<i>E. species</i> BY8						<i>E. mundtii</i> CA17					
<i>E. casseliflavus</i>						<i>E. faecalis</i> BM1					
<i>E. faecalis</i> BY10						<i>E. faecalis</i> BM2					
<i>E. faecalis</i> BY11						<i>E. faecalis</i> BM3					
<i>E. faecium</i> BY12						<i>E. faecalis</i> BM4					
<i>E. faecium</i> BY13						<i>E. faecalis</i> BM5					
<i>E. faecium</i> BY14						<i>E. faecalis</i> BM6					
<i>E. faecium</i> BY15						<i>E. faecalis</i> BM7					
<i>E. faecium</i> BY16						<i>E. faecalis</i> BM8					
<i>E. gallinarum</i>						<i>E. faecalis</i> BM9					
<i>E. casseliflavus</i>						<i>E. faecalis</i> BM10					
<i>E. casseliflavus</i>						<i>E. faecalis</i> BM11					
<i>E. casseliflavus</i>						<i>E. faecalis</i> BM12					
<i>E. casseliflavus</i>						<i>E. faecalis</i> BM13					
<i>E. faecalis</i> BY22						<i>E. faecalis</i> BM14					
<i>E. faecalis</i> BY23						<i>E. faecalis</i> BM15					
<i>E. faecalis</i> BY24						<i>E. faecalis</i> BM16					

С розов цвят- отрицателен резултат, не се наблюдава амплификационен продукт; зелен цвят- положителен резултат, наличие на специфичен амплификационен продукт.

Почти половината от тях принадлежат към групата на изолатите от кърма (47% от всички CRISPR- положителни щамове, n=14). Други 37% (n=11) от тях са изолирани от хранителни източници, последвани от 17% (n=5) които произхождат от интестиналния тракт на охлюв. От трите анализирани чрез PCR CRISPR локуси, най-разпространения е локусът „сирак“-CRISPR2 (n = 27; 79% от всички положителни щамове). CRISPR1 локуси се амплифицират в 67% от всички положителни щамове (n=20). Най-малко амплифицираният локус в изследваните щамове е CRISPR3 локусът, представен в 41% от всички анализирани щамове. Само един от изолатите (*E. faecalis* VM15) показва амплификация за *csn1* (по-късно описан като *cas9*) гена (Фигура 26).



Фиг. 17: Положителна амплификация на изолат *E. faecalis* VM15 за *csn1* гена

Анализът за разпределението на CRISPR системите сред различните ентерококови видове показва, че от всички положителни изолати, 60% (n=18) принадлежат към вида *E. faecalis*. Останалите са разпределени както следва: 13% (n = 4) *E. casseliflavus*; 7% (n = 2) *E. faecium* (CM1 и DK1) и *E. durans* (YFC2 и YFC4); и 3% (n = 1) *E. pseudoavium* (CA9), *E. pallens* (CA10), *E. devriesei* (CA13) и *E. gallinarum* (CA15). Още повече, 63% (n=30) от всички изолати, които дават положителна амплификация за гени за вирулентност и антибиотична резистентност, притежават CRISPR локуси.

Според произхода на щамовете, четири от пет CRISPR положителни изолата от *S. aspersum*, носят предимно CRISPR2 системи, а само един от тях (*E. pallens* CA10) притежава

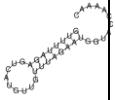

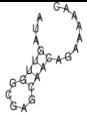
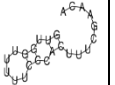
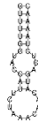
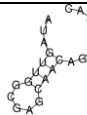
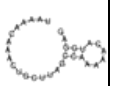
комбинацията от две CRISPR системи (CRISPR2 и CRISPR1). Сред щамовете на *E. faecalis*, изолирани от кърма (n=16), 87% (n = 14) са положителни за CRISPR локуси, а два от тях са отрицателни (13%). Интерес представлява факта, че 71% (n = 10) от тях притежават и трите типа CRISPR локуси; 21% (n = 3) съдържат комбинацията от CRISPR2 и CRISPR1. Само един от тях (*E. faecalis* BM15) показва положителна PCR амплификация за CRISPR2 локус. Това е и единственият щам, който амплифицира *csn1* (по-късно описан като *cas9*) гена.

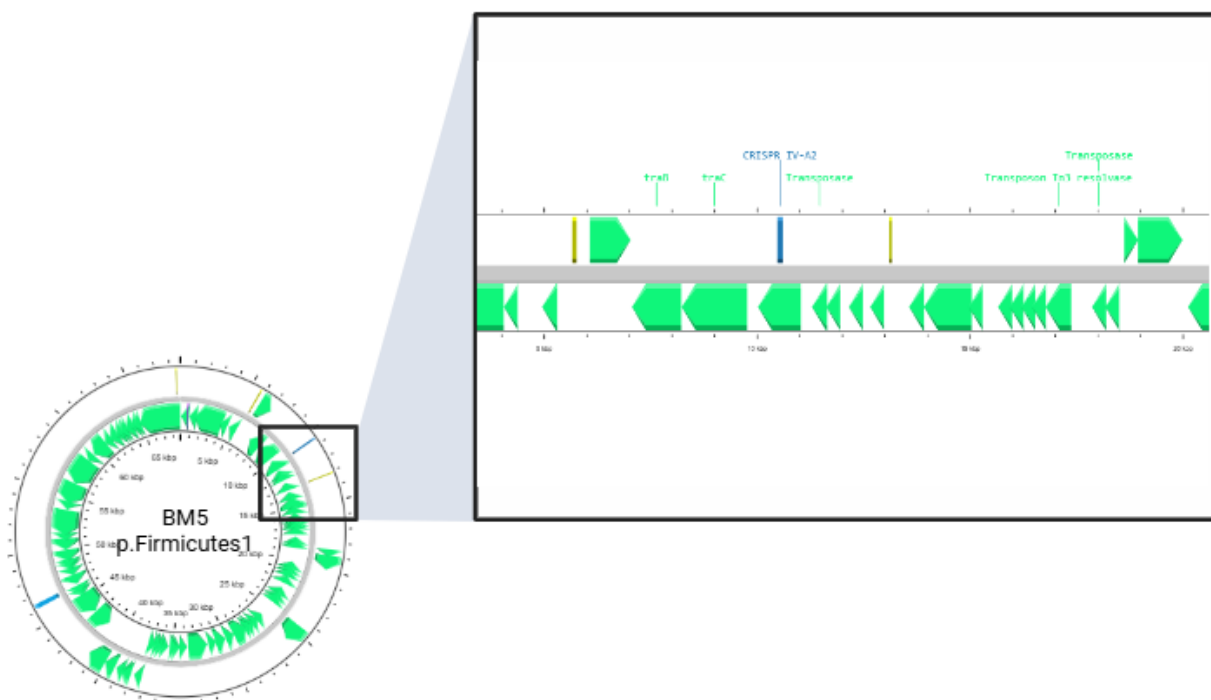
Щамовете, изолирани от храни (n=39) също показват разнообразие по отношение на типа на детектираните CRISPR системи. От тях, 28% (n=11) показват положителна амплификация за CRISPR локуси. Три изолата показват положителен профил само за CRISPR2 (*E. faecium* DK1 и *E. casseliflavus* BY20 и BY21). Останалите осем положителни щам притежават различни комбинации от трите типа CRISPR локуси. Един от тях амплифицира комбинацията от CRISPR1 + CRISPR2 (*E. casseliflavus* BY18); два щам притежават CRISPR2 + CRISPR 3 (*E. durans* YFC2 и YFC4); и други два щам - комбинация от CRISPR1 + CRISPR2 + CRISPR3 (*E. faecium* CM1 и *E. faecalis* CM4). Не са детектирани CRISPR локуси в щамовете от видовете *E. gilvus* и *E. malodoratus*.

Статистическият анализ показва значителни различия в броя на CRISPR локусите само между изолатите от кърма и храна ($p < 0.05$), както и между изолатите от кърма и охлюв ($p < 0.05$). Не са открити значителни статистически различия в броя на CRISPR локусите между изолатите от храни и охлюв ($p > 0.05$). Значителни статистически различия са открити и между броя на CRISPR локусите, детектирани в *E. faecalis* и други ентерококови видове ($p < 0.05$).

Биоинформатичните анализи потвърждават PCR резултатите за наличието на CRISPR локуси в тестваните щамове (секвенирани и потвърдени са само изолати *E. faecalis* CM4, BM5, BM12 и BM15), както и *cas9* ген само в един щам (*E. faecalis* BM15). Нещо повече, в последния са анотирани три допълнителни *cas* гена (*cas1*, *cas2* и *csn2*). След целогеномно секвениране в нашите щамове са детектирани два до три CRISPR локуса множеството, от които са локализирани в бактериалните хромозоми. CRISPR системите, локализирани в хромозомите или плазмид, са идентифицирани чрез подтипиране на CRISPR повторите. Използвайки този метод, в нашите изолати са идентифицирани четири типа CRISPR повтори: II-A, III-B, IV-A2 и VI-B1 (Таблица 13).

Табл. 10: CRISPR повтори и спейсърни секвенции в геномите на секвенираните *E. faecalis* щамове

Изolat	Секвенция на повторите	Подтипирание на повторите	Вторична РНК структура	*MCE [kcal/mol]	Спейсърна секвенция	Целеви ДНК молекули
CM4	GTTTTAGAGTCATGTTGTTAGAAT GGTACSAAAAC	II-A		-2.30	GGTTATTATGTTACTGGTTACTTTAAAGAC	хромозома
					ATAATGATGTACAATTTATCAAAACCATA	фаг
					GAAAAGCAGTTCGAGCGGAAACTGCGACCA	фаг
					GACTTACAAAAGACTGTGATTTACGTTATA	фаг
					AAACTTTTTGATTTGGCTTTTTCTCCCT	фаг
	ACAAGGTGACSAAGGGAACGTTG T	VI-B1		-7.10	CTCCTCTATGTTAAAACAAACTGCTTAGCCAAAAACATG GAGTAGATGATGAACAGC	фаг
	ATAGTTGGCGAGCAACAGAAAAAC	III-B		-3.20	TCGATATAGAATTGGACGTAGAGCCA	фаг
BM5	GTTGGTTTTCCCACTTCGAACA	IV-A2		-1.40	AAGTACTGGTATTATTGGATTCTTCTGGAC	плазмида
					AAACGCCGATTTTATCATGTTTATCCGAAG	плазмида
	GTTTTGGTACCATTCTAACAACAT GACTCTAAAAC	II-A		-3.40	TCTAATTTTTGAGTAATCGTACCAACTTGG	хромозома
					CTACGTCTTAACAAAGATAATTTAAAAGGT	фаг
				GAACTACGTTTAAACCCGAAACCCACTA	хромозома	
				TAGGTAAGTAACCTAACCCCTAGTCAATCG	хромозома	
	ATAGTTGGCGAGCAACAGAAAAAC	III-B		-3.20	TCGATATAGAATTGGACGTAGAGCCA	фаг
BM12	GTTTTAGAGTCATGTTGTTAGAAT GGTACSAAAAC	II-A		-1.60	TAGATGATGAACAGTACAAGGTGACSAAGGGAACGTTG TCTCCTCTGTGC	фаг
					AAGTACGGCATTACGCATTCCCACTTTCT	фаг
					GTAACAAACGATTAACCTTTCGCATAGTCAT	фаг
					AACCGAACTTACACCAACTGCGGATGGTAT	фаг
					TATCGAAAATGATGTATTAATTTTAGGCTA	фаг
					TACCTATGCAGACATTAAGAATTTACCAGA	фаг
					TTATTGAGAATCTGAAACATTTAGTTCAT	фаг
					ATTTTGATGCATTAGCACAAAATCAAAAG	фаг
	ATTACTTGTTAAGGCTTCAATATCAATTC	фаг				
				AAACTTTTTGATTTGGCTTTTTCTCCCT	хромозома	



Фиг. 18: Локализация на CRISPR-Cas системата тип IV-A2 върху плазмидна рMG2200 в шам *E. faecalis* BM5. Изображението е генерирано чрез Map Builder в Proksee 2.0.5.

Това е единствената CRISPR-Cas система, таргетираща плазмиди в това проучване. След анотация на плазмидната секвенция, се открива, че тази CRISPR система се намира близо до транспозонни елементи (*tra* гени, транспозази и резолвази) (**Фигура 27**).

Вторичните РНК структури и минималната свободна енергия (MCE) на повторите са предвидени чрез RNAfold уебсървър. MCE стойностите варират от -7.10 kcal/mol до -1.4 kcal/mol. Вторичната РНК структура с най-ниска MCE е част от IV-A2 CRISPR системата, локализирана в плазмид на *E. faecalis* BM5 (**Таблица 13**).

Всички секвенирани щамове, включително единствения шам с функционална CRISPR система (*E. faecalis* BM15), съдържат плазмиди в геномите си, както и други мобилни генетични елементи, като например транспозонни секвенции (описани по-горе).

CRISPR системите са широко описвани в литературата както като предпазващи от фагови инфекции, така и от друга страна като механизъм, формиращ бариера за хоризонталния трансфер на гени, тъй като тези системи могат да възпрепятстват приема на плазмиди и друга екзогенна ДНК (Rath et al., 2015). Във всички тествани щамове (с изключение на *E.*

faecalis BM15) в това проучване липсват CRISPR системи или има нефункционални такива (нямат *cas* гени). Някои автори обясняват загубата на *cas* гени като механизъм на мултирезистентните бактерии да задържат гените си за антибиотична резистентност, ценни за тяхното оцеляване (Hullahalli et al., 2019). В нашето проучване 63% от всички щамове, положителни за гени за антибиотична резистентност и вирулентност корелират с нефункционални CRISPR системи, което може да бъде обяснено със самоинактивация на тези системи с цел задържане на гените за антибиотична резистентност и вирулентност в клетките. Въпреки това, щамът с единствената функционална CRISPR система в това проучване (*E. faecalis* BM15) също съдържа гени за антибиотична резистентност и вирулентност. Някои автори описват липсата на функционални CRISPR системи като дължаща се на мутации в промоторите на *cas* гените (Pastuszka et al., 2021), което може да обясни и наблюдаваните резултати в щама *E. faecalis* BM15. От друга страна, данни показващи положителна корелация между функционални CRISPR системи и наличие на гени за антибиотична резистентност също могат да се срещнат в научната литература (Palmer & Gilmore, 2010). Друго несъответствие с описаната в литературата теория за взаимоотношението между CRISPR системите и гените за антибиотична резистентност и вирулентност е, че при секвенираните геноми само в един щам (*E. faecalis* BM5) са детектирани спейсъри, таргетиращи плазмидни секвенции. Така твърдението, че инактивирането на CRISPR системите е резултат от необходимостта на клетките да задържат необходими плаزمиди в клетките, не се потвърждава. По-голямата част от спейсърите съвпадат с фагова ДНК. Друга част от спейсърите самотаргетира бактериалната хромозома. Подобни наблюдения са описвани и в литературата (Tao et al., 2023). Някои автори дефинират самотаргетиращите спейсъри като тип генни регулаторни системи (Sorek et al., 2008). Други описват този тип самотаргетиране като част от автоимунитета при бактериите (Stern et al., 2010). Този тип взаимодействие е свързано с частична или пълна загуба на активността на CRISPR системите (Stern et al., 2010). В нашето проучване, както и в литературата (Huescas et al., 2019), CRISPR3 локусите са най-слабо амплифицираните сред изучаваните ентерококови щамове.

Информацията в научната литература за разпространението на CRISPR системите е фокусирана предимно върху клинични изолати на щамове на *E. faecalis* и *E. faecium* (Gholizadeh et al., 2021). Данните за тези адаптивни системи в други ентерококови видове са оскъдни, дори

още повече по отношение на неклинични изолати. Разпространението на CRISPR-Cas системите може да варира между видовете поради различния селективен натиск упражняван от разнообразните условия на околната среда, която обитават ентерококите видове (Lyons et al., 2015). В тази разработка е описана липсата на CRISPR локуси в щамове от видовете *E. gilvus* (n = 1) и *E. malodoratus* (n = 1). Описано е и наличието на CRISPR локуси в представители на видовете *E. pseudoavium*, *E. pallens* и *E. devriesei*, което към момента на написване на тази дисертация не е споменавано в CRISPR проучвания. В подобно на настоящето проучване, сред 110 изследвани ентерококи с неклиничен произход, са детектирани 517 различни CRISPR спейсъра във видове различни от *E. faecalis* и *E. faecium* [*E. avium* (n = 2), *Enterococcus cecorum* (n = 3), *E. durans* (n = 6), *E. hirae* (n = 10), *E. mundtii* (n = 6), *Enterococcus silesiacus* (n = 1), *Enterococcus thailandicus* (n = 1) и *Enterococcus* sp. (n = 5)] (Palmer & Gilmore, 2010).

CRISPR повторите в секвенираните щамове са типирани като четири различни подтипа (II-A, VI-B1, III-B и IV-A2). Всички секвенирани щамове притежават повтор, подтипирани като II-A тип. Такава повторна последователност е често откривана и в други разработки (Tao et al., 2023). Един CRISPR локус е идентифициран и в плазмид (pMG2200 в щам *E. faecalis* BM5). Това е интересен резултат, имайки предвид еволюцията и разпространението на CRISPR системите. Според литературата, дефектните варианти губят интерферентните и адаптационни функции и придобиват роли, различни от адаптивния имунитет при бактериите. Този тип CRISPR варианти са локализираны върху транспозони и плазмиди (Koonin et al., 2017). Системата, локализирана върху плазмид в тази дисертация, е разположена близо до транспозази, резолвази и гени, отговорни за не-половия трансфер на генетични елементи в генома. Подобни резултати са описани в литературата, като един от най-споменавания подтип CRISPR система е I-F, локализирана в близост до голямото транспозонно семейство Tn7 (Peters et al., 2017). Redando и сътр. (Pinilla-Redondo et al. 2020) също описват, че прокариотните мобилни генетични елементи (предимно плазмиди) са отговорни предимно за закодирането в тях на тип IV CRISPR-Cas локуси. Те предполагат, че за да доминират в гостоприемника си, плазмидните елементи използват тип IV системите за ликвидиране на други плазмиди със сравними характеристики (Pinilla-Redondo et al. 2020). Биоинформатичните анализи с RepeatFinder идентифицират повтора в плазмидата на *E. faecalis* BM5 като част от IV-A2 система.

Всички вторични РНК структури на повторите формират така наречените „stem-loop” структури с ниска минимална свободна енергия, което е индикация за тяхната стабилност.

Резултатите в това проучване описват няколко аспекта, индикиращи наличието на екзогенна ДНК под формата на плазмиди, мобилни генетични елементи или гени за антибиотична резистентност и вирулентност във връзка с неактивни CRISPR системи. Анализираните спейсъри потвърждават плазмидни целеви участъци само в един от четирите секвенирани щама, докато във всички CRISPR локуси са детектирани самотаргетиращи спейсъри. Тези резултати основно описват придобиването на екзогенна ДНК като последствие от CRISPR инактивация, а самотаргетиращите спейсъри като основната причина.

VI. Характеристики на ентерококите с потенциал за приложение в пробиотични продукти

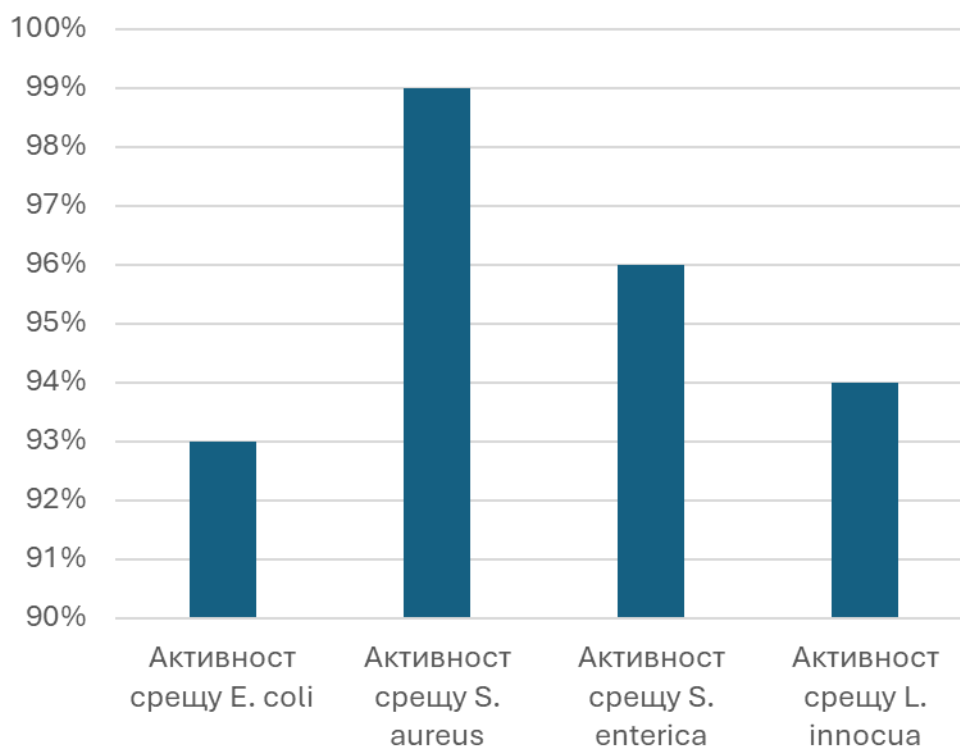
1. Антагонизъм на ентерококите към патогенни микроорганизми

Следващите анализи в тази дисертация са свързани с определяне на потенциала на ентерококите за използването им като пробиотици срещу патогенни микроорганизми. Тъй като ентерококовите видове са широко разпространени в храните, както показват и настоящите резултати, като тест микроорганизми са избрани типови култури на някои хранителни патогени, често срещани в храните – *E. coli*, *S. enterica* и *L. innocua*. *Staphylococcus aureus* също е подбран за тестване, тъй като е известен като причинител на редица заболявания и през последните година е докладван като отговорен за фаталния изход на редица инфекции, поради придобиването на метицилинова резистентност (Gajdács, 2019).

Като контролни щамове на нашите ентерококи в изследванията са използвани типови култури на видовете *E. faecalis* и *E. faecium*, както и щам *E. faecium* W54, предлаган в пробиотичен продукт в търговската мрежа (препарат Omnibiotic).

Проведените изследвания на ко-култивиране между ентерококи и патогени показват, че повече от 90% от изследваните ентерококови щамове имат антибактериална активност срещу тест микроорганизмите (**Фигура 28**). Ентерококите, подобно на лактобацилите имат способността значително да понижават рН на средата, която населяват. Поради тази причина

образуването на значими зони на инхибиране при ко-култивиране между патогени и изследваните ентерококи е донякъде обяснимо явление. Друг фактор, който може да окаже влияние, е наличния в някои щамове оперон за синтеза на цитолизин. Цитолизинът е далечно свързан с клас бактериоцини, известни като лантибиотици (Shankar et al., 2004). Освен ролята му във вирулентността при ентерококите, цитолизинът е описван и като способен да лизира широк спектър от таргетни клетки, както от Грам-положителни бактерии, така и еукариотни клетки (Сох, 2005).



Фиг. 19: Инхибиране (в %) на тест – микроорганизмите от изследваните ентерококи



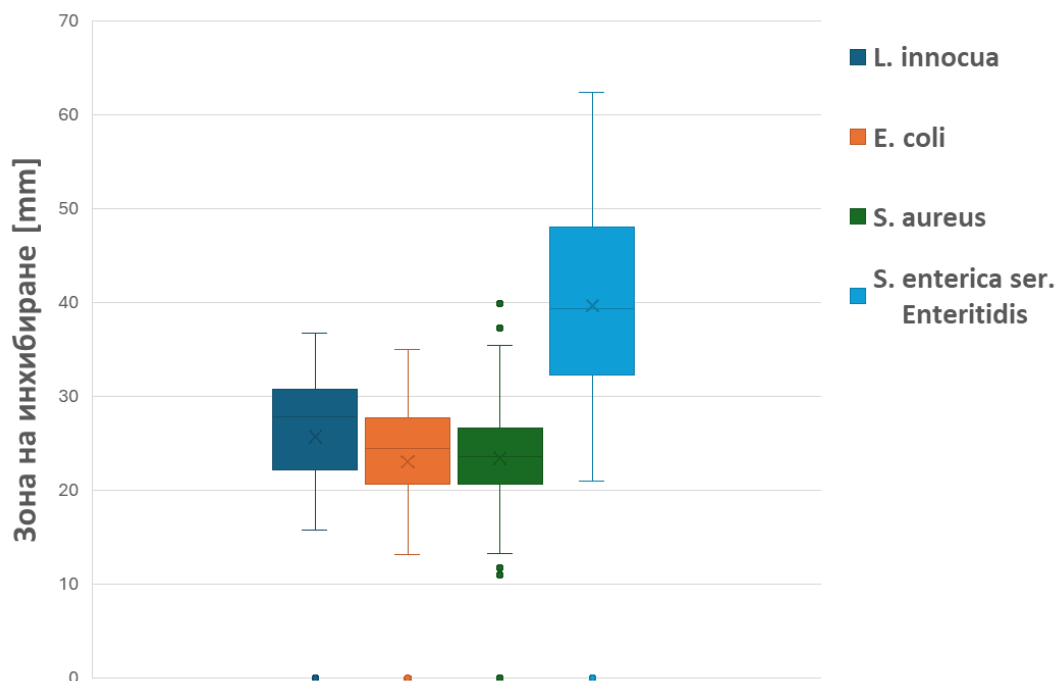
Фиг. 20: Инхибиране на растежа на *L. innocua* от щам *E. faecium* BY14

В настоящото проучване най-голям процент от изследваните ентерококи (99%) показват активност срещу *S. aureus*. Потискането на развитието на щамове на *S. aureus* от ентерококи често е докладвано в литературата (Viçosa et al., 2019). Някои автори обясняват активността на ентерококите срещу този патоген с намаляването на рН в средата и/или с увеличени нива на лактат в средата (Viçosa et al., 2019, Delbes et al., 2006). Процентът на щамове, проявяващи антагонизъм срещу типовата култура на *L. innocua* е малко по-нисък (94%). Инхибиращото действие на ентерококите срещу други Грам-положителни бактерии е очаквано явление, тъй като е свързано с конкуренцията за сходни хранителни вещества (Haines & Harmon, 1973). От тестваните Грам-отрицателни тест-микроорганизми, най-чувствителна към присъствието на ентерококите (96%) е *S. enterica*. Най-малък процент от ентерококите показват активност срещу типовата култура на *E. coli*. Всички тествани контролни щамове ентерококи показват инхибираща активност срещу използваните бактериални патогени (**Таблица 14**). Тези резултати показват и важността на ентерококите за поддържането на баланса на нормалната чревна микробиота. Въпреки че инхибиторното действие срещу Грам-отрицателните микроорганизми е слабо описано в литературата, синтезата на киселини и конкуренцията за хранителни вещества също могат да окажат влияние върху развитието и размножаването на изследваните целеви микроорганизми. Друг фактор е наличието на различни молекули по повърхността на клетъчната стена на ентерококите, които могат да агрегират или да инхибират тези микроорганизми.

Табл. 11: Инхибиране на тест микроорганизмите от контролни щамове ентерококи

Контролни щамове	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. enterica</i>	<i>L. innocua</i>
<i>E. faecalis</i> 3915	24 mm	20 mm	31 mm	30 mm
<i>E. faecium</i> 8754	27 mm	24 mm	36 mm	34 mm
<i>E. faecium</i> W54 (Omnibiotic)	29 mm	24 mm	33 mm	41 mm

Трябва да се отбележи обаче, че изследваните от нас ентерококи показват близки или по-големи зони на инхибиране от типовите контролните щамове (**Фигура 30**). Спрямо видовете *E. coli*, *S. aureus* и *S. enterica*, някои от изследваните ентерококови изолати дори показват по-големи зони на инхибиране от положителната контрола (пробиотичния щам от търговската мрежа). Най-големи зони на инхибиране се наблюдават срещу *S. enterica*, като при някои щамове те надхвърлят 60 mm в диаметър. Това е донякъде неочакван резултат, имайки предвид положителната асоциация между ентерококи и салмонели в някои храни и водни проби (Hansen et al., 2016, Efstratiou et al., 2009). От друга страна, обитаването на едно и също местообитание на тези два вида бактерии би могло да доведе до развиване на механизми, свързани с конкуренцията и оцеляването на вида.



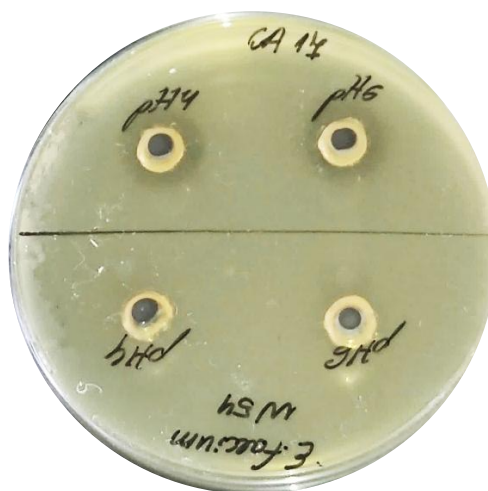
Фиг. 21: Сравнение на зоните на инхибиране на тестваната ентерококова колекция срещу избрани тест микроорганизми

Една от възможностите за наблюдаваните до тук резултати е синтезата на бактериоцини от ентерококите, признак често описван в научната литература (Charles et al., 2007). Поради тази причина анализите са насочени към проверка на антибактериална активност на безклетъчните супернатанти на ентерококовите изолати. Тъй като за ентерококите е известно, че продуцират млечна киселина, влиянието на рН е отстранено като рН на супернатантите е повишено от рН 4 до рН 6. При тези условия обаче срещу Грам-отрицателните патогени не е отчетена активност на тестваните супернатанти (дори и на щама *E. faecium* W54, изолиран от Omnibiotic, използван за положителна контрола). Установена е активност само срещу *L. innocua* при седем от изолатите от охлюв. Трябва да се отбележи, че отново не е отчетена антимикуробна активност на супернатантата от щам *E. faecium* W54 срещу *L. innocua* (Таблица 15 и Фигура 31). Сред активните изолати, 86% са представители на вида *E. mundtii*. Само един от тях е идентифициран потенциално като представител на вида *E. casseliflavus*. В литературата към момента са описвани различни бактериоцини, продуцирани от различни видове ентерококи, като мундтицина от *E. mundtii* също е докладван (Charles et al., 2007). Синтезата на бактериоцини от вида *E. mundtii* обаче е рядко срещана сред щамовете от този вид. Ferreira и

сър. (2007) описват само четири бактериоцин-продуциращи щама от общо 70 изследвани представители на вида *E. mundtii*.

Табл. 12: Антибактериална активност на безклетъчни супернатанти на ентерококи, изолирани от ГИТ на *C. aspersum*

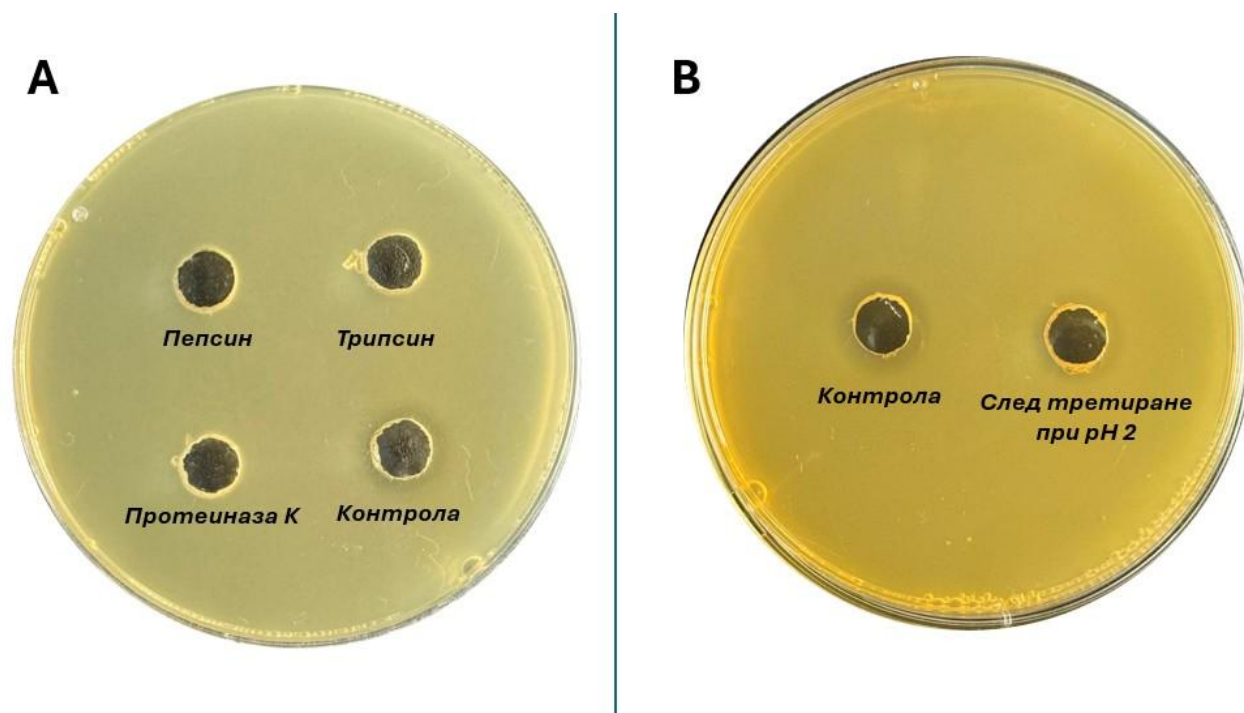
Щам	pH4	pH6
<i>E. mundtii</i> CA17	14.53 mm	13.48 mm
<i>E. mundtii</i> CA7	15 mm	15 mm
<i>E. mundtii</i> CA8	14.74 mm	14.74 mm
<i>E. casseliflavus</i> CA5	16.32 mm	15.33 mm
<i>E. mundtii</i> CA6	16 mm	14.9 mm
<i>E. mundtii</i> CA4	15.83 mm	14.1 mm
<i>E. mundtii</i> CA1	14.6 mm	15.8 mm



Фиг. 22: Активност на супернатантата на щам *E. mundtii* CA17 срещу *L. innocua*. Не се наблюдава активност на супернатантата на пробиотичен щам *E. faecium* W54.

Следващите анализи са насочени към определяне както на природата на антибактериалните вещества в супернатантите на седемте щама, така и тяхната устойчивост към различни фактори. Първият от анализите е ориентиран към третиране на безклетъчните супернатантите с различни протеолитични ензими. Като контрола е използвана съответната нетретирана неутрализирана супернатанта. Оказа се, че всички антибактериални вещества

губят функцията си при третиране с трипсин, пепсин и протеиназа К (**Фигура 32a**). Допълнителният анализ за устойчивост на антибактериалните вещества към рН 2 (оптималното рН на пепсина) доказва, че ниското рН не им влияе значително, тъй като макар и по-слаба, те не губят активността си след такова третиране (**Фигура 32b**). Това доказва, че при извършените условия на експеримента, този фактор може да бъде изключен, което доказва пепсинът като отговорния за загубата на антилистериозната активност. Тези резултати потвърждават белтъчния характер на веществата, както и чувствителността им към ензимите в гастроинтестиналния тракт.



Фиг. 23: (А) Чувствителност на антибактериални вещества, продуцирани от *E. mundtii* CA17 към различни видове ензими; (В) Устойчивост на антибактериалните вещества след третирането им при рН 2 (оптимално рН на пепсина).

Друга важна характеристика на бактериоцините е устойчивостта им към различни температури. В тази връзка е изследвано влиянието на температурата върху потенциалните бактериоцини в супернатантата на седемте щамове ентерококи. Като контрола, е използвана съответната супернатанта без тя да бъде нагрявана. Резултатите показват наличие на термостабилни белтъчни молекули в супернатантата на всички тествани щамове (**Фигура 33**), които са устойчиви дори при третиране от 100°C. Активността се губи само при автоклавиране

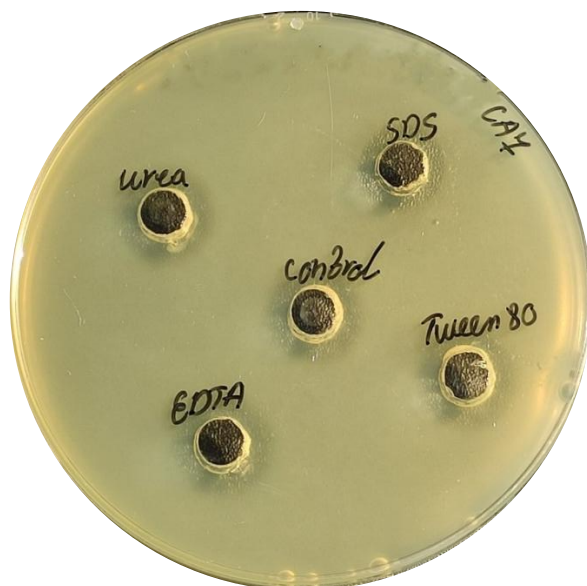
при 121°C за 15min. В литературата са описани две групи ентероцини, проявяващи устойчивост при високи температури - клас I и клас II ентероцини (Wu et al., 2022). Ентероцините от клас I се класифицират като малки (<10 kDa) термостабилни молекули, които претърпяват посттранслационни модификации, докато ентероцините от клас II представляват малки (<10 kDa) термостабилни молекули, които не претърпяват модификации след трансляция. Характерни представители на клас I ентероцините са цитолизинът и ентероцин AS-48 (Cruz et al., 2013). Характерно за ентероцин AS-48 е устойчивостта му към различни денатуранти поради сферичната му структура, формираща хидрофобно ядро (José et al., 2014). От друга страна, за клас II ентероцити е характерно инхибиране на растежа на *Listeria monocytogenes* (Eijsink et al., 1998), което съвпада с получените резултати, тъй като се наблюдава антибактериална активност срещу *L. innocua*. Термичната стабилност на изследваните антибактериални вещества позволява приложението им в млечни продукти или други температурно обработени храни.



Фиг. 24: Влияние на температурата върху активността на бактериоцин продуциран от щам *E. mundtii* CA17

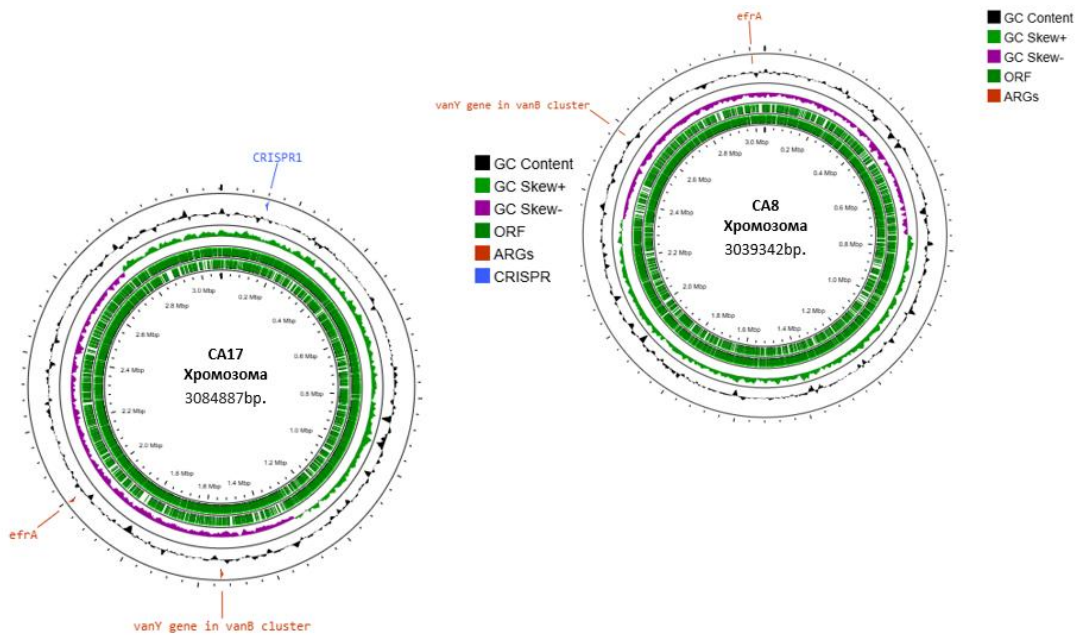
Друг важен критерий за приложимостта на антибактериалните пептиди е влиянието на някои съфактанти върху стабилността на бактериоцините. Като контрола, супернатантите са смесени с ултрачиста стерилна вода. Получените резултати показват устойчивост на всички изследвани бактериоцини към урея, SDS, EDTA и Tween 80 (Фигура 34). Подобно на нашите

проучвания, предходни изследния също докладват, че ентероцините остават стабилни след третиране със сърфактанти (Isleroglu et al., 2011; Kumar et al., 2010; Perumal & Venkatesan 2017). Стабилността на изследвания бактериоцин към сърфактанти индикира, че е изключително ценен за употреба в емулгирани храни като сладоледи, кремообразни сосове, печива и други.



Фиг. 25: Влияние на сърфактанти върху активността на бактериоцин продуциран от щам *E. mundtii* CA7

Една от последните стъпки по анализирането на бактериоцините, е тяхното идентифициране. За целта два от бактериоцин-продуциращите щамове са целогеномно секвенирани и техните секвенции са полирани с цел по-нататъчно анализиране. И двата щамове са представители на вида *E. mundtii* и в геномите им са аотирани единствено техните хромозоми (Фигура 35). Не е отчетено наличието на плазмиди. Представителите на вида *E. mundtii* притежават хромозоми с дължина около 3 МВ и GC съдържание от 38.6%. Депозирането на тези секвенции предстои да бъде извършено. Отсъствието на плазмиди в секвенираните щамове е положителна черта, тъй като често те носят гени за резистентност и/или вирулентност. Наличието на такива характеристики (гени за антибиотична резистентност и вирулентност) са нежелани в пробиотични щамове, какъвто е и потенциалът на изследваните.



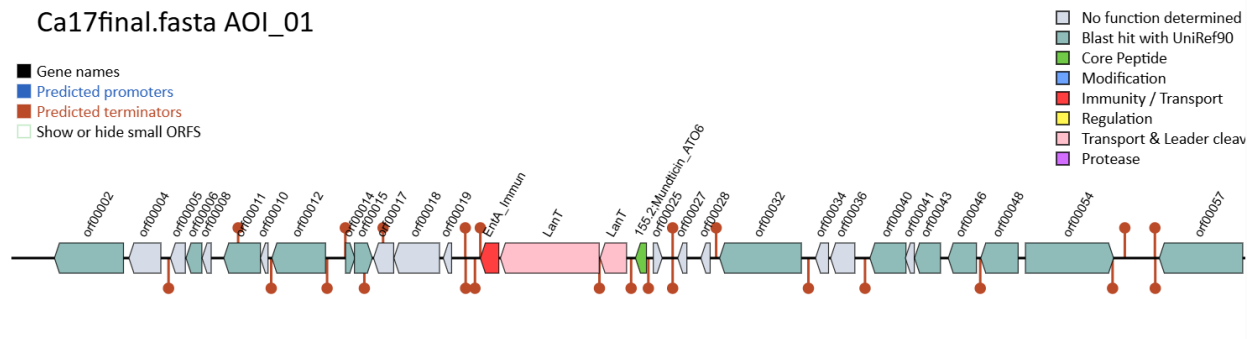
Фиг. 26: Геномни карти на щамове *E. mundtii* CA8 и CA17. С червен цвят са обозначени гени за антибиотична резистентост, а в син цвят- CRISPR локуси. Изображението е генерирано чрез Map Builder в Proksee, версия 2.0.5.

След целеви анализ на секвенциите в BAGEL платформата, е определено наличието на две вещества с пептидна природа в хромозомата и на двата щам: rSAM ензим (отговорен за формирането на тиоетерни връзки в посттранскрипционно модифицирани пептиди - сактипептиди) и бактериоцинът мундтицин (**Таблица 16**).

Табл. 13: Идентифицирани вещества с антибактериални свойства

Начало	Край	Клас
2371438	2391609	Мундтицин
2694293	2714293	Сактипептиди

В генния клъстер за биосинтезата на сактипептиди, освен гени за ензимни модификатори, се откриват и гени за мембранни белтъци/транспортни системи (**Фигура 36**). Прекурсорните пептиди за синтезата на сактипептида не са идентифицирани, но няколко гена с малки рамки на четене са детектирани и са разположени непосредствено преди гена за rSAM ензима. Идентифицирането на сактипептиди в бактериите е сравнително ново течение, набиращо скорост с достъпността на секвенционните анализи. Към момента само няколко представители на това семейство са проучени детайлно, сред тях субтилозин А, туринцин Н, двукомпонентният туринцин CD, туринцин Z/Хуазацин, стрептосактин, Huicin 4244, руминококоцин С1 и наскоро идентифицирания QmpA (Ali et al., 2022). Нито един от тези сактипептиди не е идентифициран в ентерококови видове, но се наблюдават в други Грам - положителни бактерии (представители на род *Bacillus*, както и видовете *Ruminococcus gnavus*, *Streptococcus spp.*) (Chen et al., 2021). В анализирания в тази дисертация генен клъстер са идентифицирани 8 малки отворени рамки на четене с потенциал за кодиране на прекурсорните молекули на сактипептида (sORF_6, sORF_16, sORF_7, sORF_15, sORF_8, sORF_14, sORF_9 и sORF_13). Всички те са разположени непосредствено преди модификаторния ензим и кодират къси пептидни секвенции, което е характерно за сактипептидите. Част от тях обаче не съдържат цистеинови аминокиселинни остатъци, необходими за формиране на тиоетерна връзка, характерна за сактипептидите (Chen et al., 2021) (sORF_16, sORF_7, sORF_9 и sORF_13). Така, потенциалните гени за прекурсора на сактипептида остават sORF_6, sORF_15, sORF_8 и sORF_14. Поради разнообразната структура на сактипептидите, не се изключва и възможността за синтезата на сактипептида от няколко структурни гена, какъвто е например туринцин Н (Hyungjae et al., 2009).



Фиг. 28: Генен клъстер кодиращ мундтицин. В яркозелено е отбелязан гена кодиращ мундтицин, в розов цвят- транспортни системи за изнасяне на мундтицина извън клетката, а в червено- ген формиращ имунитет към мундтицин на клетката-продуцент. Тъмночервените знаци по секвенцията обозначават предвидени терминатори. Изображението е генерирано чрез BAGEL3 платформата.

Комбинацията от тези две пептидни молекули затруднява интерпретацията на резултатите, както и би затруднило пречистването им една от друга.

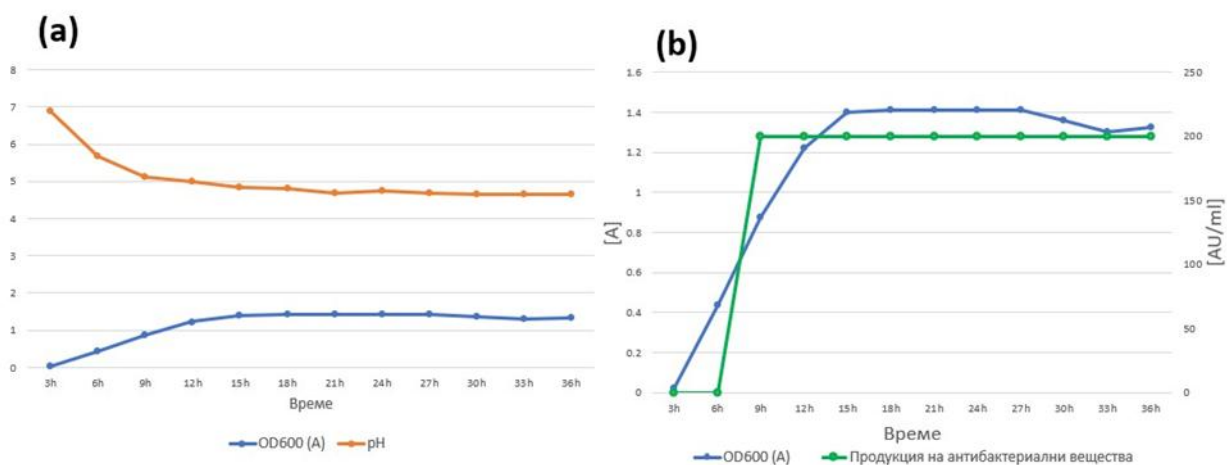


Фиг. 29: 3D структура на белтъчната молекула на бактериоцина мундтицин. Изображението е генерирано в AlphaFold платформата.

След идентификацията е предвидена и белтъчната структура на мундтицина (**Фигура 38**). Дължината на веригата на мундтицина е 58 аминокиселинни остатъка, а молекулната маса е 5.879 Da.

Последната стъпка по характеризирането на антибактериалните вещества е определяне на синтезата им спрямо динамиката на растеж на щама (**Фигура 39 b**). Определена е синтезата на киселини в супернатантата спрямо растежа на културата, които отново могат да имат потискащо действие за развитието на някои бактерии (**Фигура 39 a**). Резултатите показват, че рН в културалната течност започва да намалява още на третия час от култивирането, достигайки до плато към 12-ти час от размножаването на културата. Наличие на антибактериални вещества в супернатантата се наблюдава още на деветия час от култивирането на щама, в средата на логаритмичната фаза на растеж на културата. В така анализирани условия на култивиране, бактериоциновият титър остава постоянен (200AU/ml) до началната

фаза на отмиране на културата. В сравнение с други бактериоцини в литературата, ниските нива на индукция на тези пептиди в културалната течност ограничават практическото приложение им (Gaaloul et al. 2014).



Фиг. 30: Графики на продукцията на антибактериални вещества спрямо растежната крива на щам *E. mundtii* CA17 (a) и продукцията на киселини (b)

2. Оценка на безопасността на щам *E. mundtii* CA8 и CA17 за употребата им като пробиотици

Въпреки че някои ентерококи са причинители на вътрешболнични инфекции и носят риск за здравето на човека, Световната здравна организация признава, че някои щамове от род *Enterococcus* показват пробиотични характеристики и, в момента на включването им в пробиотичен препарат не проявяват ванкомицинова резистентност. Поради тази причина производителят трябва да докаже, за всеки един пробиотичен щам (включително и тези с GRAS статус), че не представлява значителен риск по отношение на трансфера на антибиотична резистентност или други опортюнистични вирулентни характеристики (FAO/WHO, 2002) Поради тази причина е определено наличието на някои гени, свързани с безопасността, при използването на съответните щамове като потенциални пробиотици. В щамовете *E. mundtii* CA17 и *E. mundtii* CA8 не са амплифицирани гени за антибиотична резистентност. В геномите на двата щамове са детектирани единствено гените *efrA* и *vanY*

(част от *vanB* клъстер). Генът *efrA* е част от хетеродимерен ABC транспортер, който служи като ефлукс помпа за множество антибиотици (Jonas et al., 2001; Lee et al., 2003). Антибиотична резистентност при бактериални щамове обаче се наблюдава единствено, когато *efrA* и *efrB* гените биват коекспресирани (Lubelski et al., 2007). Гена *vanY* е част от оперон за резистентност към антибиотика ванкомицин. Наличието единствено на този ген обаче не е достатъчно за експресия на ванкомицинова резистентност. Белтъкът, който кодира този ген, се експресира единствено когато са налице и други *van* гени. Генът *vanY* има по-скоро спомагателна функция в проявата на ванкомицинова резистентност. (Arthur et al., 2001) По отношение на фенотипна антибиотична резистентност, и в двата щамове не се наблюдава резистентност към тестваните антибиотици.

В геномите на двата щамове CA8 и CA17 не са детектирани известни към момента гени за вирулентност. Не се наблюдават и фенотипни признаци за вирулентност спрямо използваните в тази разработка методи (липсва дори α -хемолиза). Това е донякъде неочаквано, тъй като гени, кодиращи агрегационни вещества, повърхностни клетъчни белтъци и адhezини (*asaI*, *esp*, *efaA* и *ace*), са често срещани сред ентерококите и участват директно в процесите на адhezия към клетките на гостоприемника (Chajęcka-Wierzchowska & Łaniewska-Trokenheim, 2017). Предишни разработки на ентерококи, изолирани от сирена, показват силно присъствие на тези гени в *E. faecalis* (C̄amara et al., 2020, Domingos-Lopes et al., 2017). Въпреки това, тези вирулентни фактори също не са детектирани в изолати на *Enterococcus lactis* (Braňek et al., 2018). Липсата на гени, кодиращи цитолизин и желатиназа потвърждават ниската вирулентност на изолатите от този вид (*E. mundtii*), тъй като тези гени кодират продукцията на токсични вещества, имащи решаващ ефект върху тъканите на гостоприемника (Chajęcka-Wierzchowska & Łaniewska-Trokenheim, 2017).

Описаните характеристики на тези два щамове *E. mundtii* CA8 и CA17 ги прави подходящи за използването им като пробиотици. Необходими са обаче допълнителни *in vitro* и *in vivo* изследвания, които да допълнят положителния ефект на изолатите спрямо човешкия организъм, както и да отхвърлят потенциални негативни ефекти при прилагането им.

Изводи

1. Вирулентният потенциал и антибиотичната резистентност при ентерококите е зависима от видовата принадлежност и произхода на щамовете.
2. Рискът за придобиване на потенциално опасни инфекции от ентерококи е най-добре изразен при вида *E. faecalis*, поради откриване на значимо количество експресиращи се гени за вирулентност и антибиотична резистентност.
3. Изолатите от човешки произход (кърма) се характеризират с най-висок вирулентен потенциал и антибиотична резистентност.
4. Растително-асоциираните ентерококи, като *E. mundtii* и *E. casseliflavus*, показват най-малък потенциал за предизвикване на бактериални инфекции.
5. Повечето детектирани CRISPR системи не са активни поради липсата на Cas белтъци и на самотаргетиращи спейсъри, което прави изследваните ентерококови щамове чувствителни към бактериофаги и способни за придобиване на екзогенна ДНК под формата на плазмиди.
6. Детектирането на *cas* гени в една от CRISPR системите (*E. faecalis* BM15) предполага активност на системата срещу фагова ДНК, но не и срещу гените, носители на антибиотична резистентност.
7. Детекцията на неактивни CRISPR системи в един от плазмидите на един от щамовете (*E. faecalis* BM5) подсказва потенциална алтернативна роля на CRISPR системите в конкуренцията на плазмидите в клетката или за трансфера на тези системи.
8. Представители на вида *E. mundtii* са характеризирани като безопасни продуценти на антибактериални вещества, активни срещу *L. innocua* и имат потенциал да бъдат използвани като пробиотици или биоконсерванти в храни.
9. Анализирани и секвенирани са пълният геном на щам *E. mundtii* CA8, синтезиращ мундтицин. Този щам не съдържа в генома си CRISPR системи, гени за вирулентност, както и гени за антибиотична резистентност, които могат да бъдат предадени на други щамове и да експресират фенотипно антибиотична резистентност.

Приноси

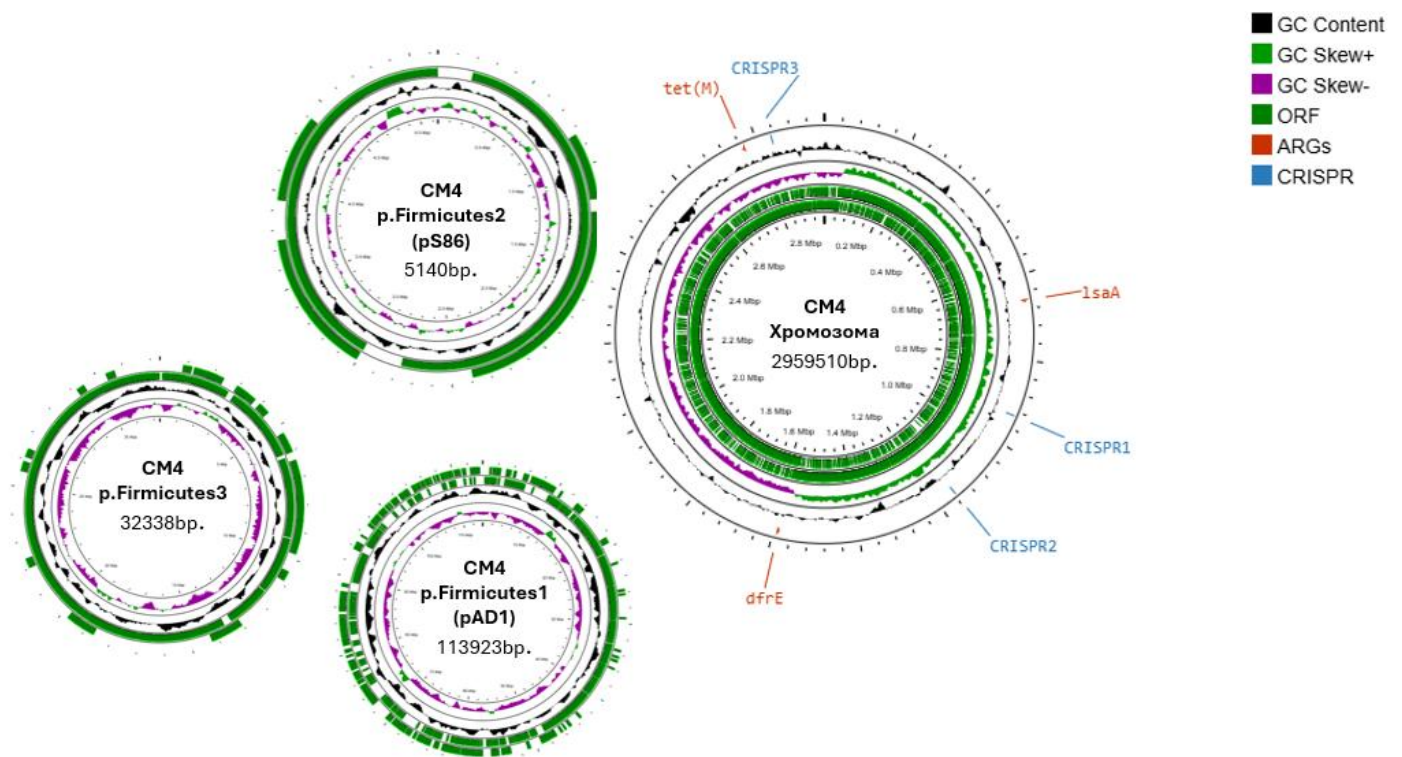
I. Приноси с фундаментален характер

1. За първи път е проведено сравнително проучване на положителните и отрицателните характеристики на неклинични ентерококи, изолирани от различни екологични ниши в България.
2. За първи път е проведено проучване за CRISPR системите в ентерококови популации в България, което ще спомогне за характеризирането на устойчивостта на тези микроорганизми към бактериофаги и за потенциала им да придобиват мобилни генетични елементи.
3. Характеризиран е мобилният генетичен елемент, отговорен за трансфера на гена *tetM*, определящ резистентност на ентерококите към тетрациклин в хранителни и неклинични изолати.

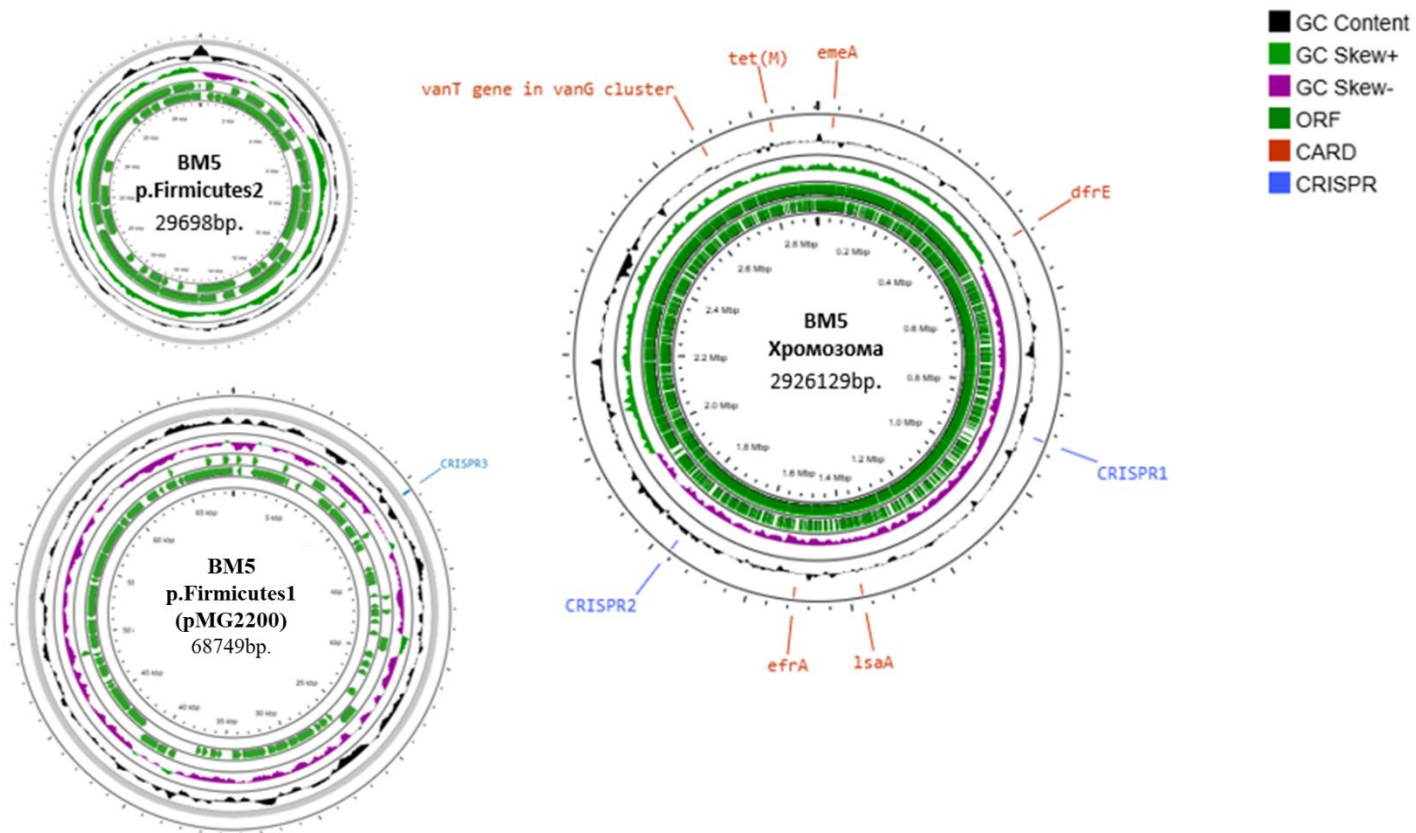
II. Приноси с приложен характер

1. Изолиран е бактериален щам, представител на вида *E. mundtii*, продуциращ бактериоцина мундтицин, с потенциал за използването му като пробиотик или използването на бактериоцина като биоконсервант за храни.

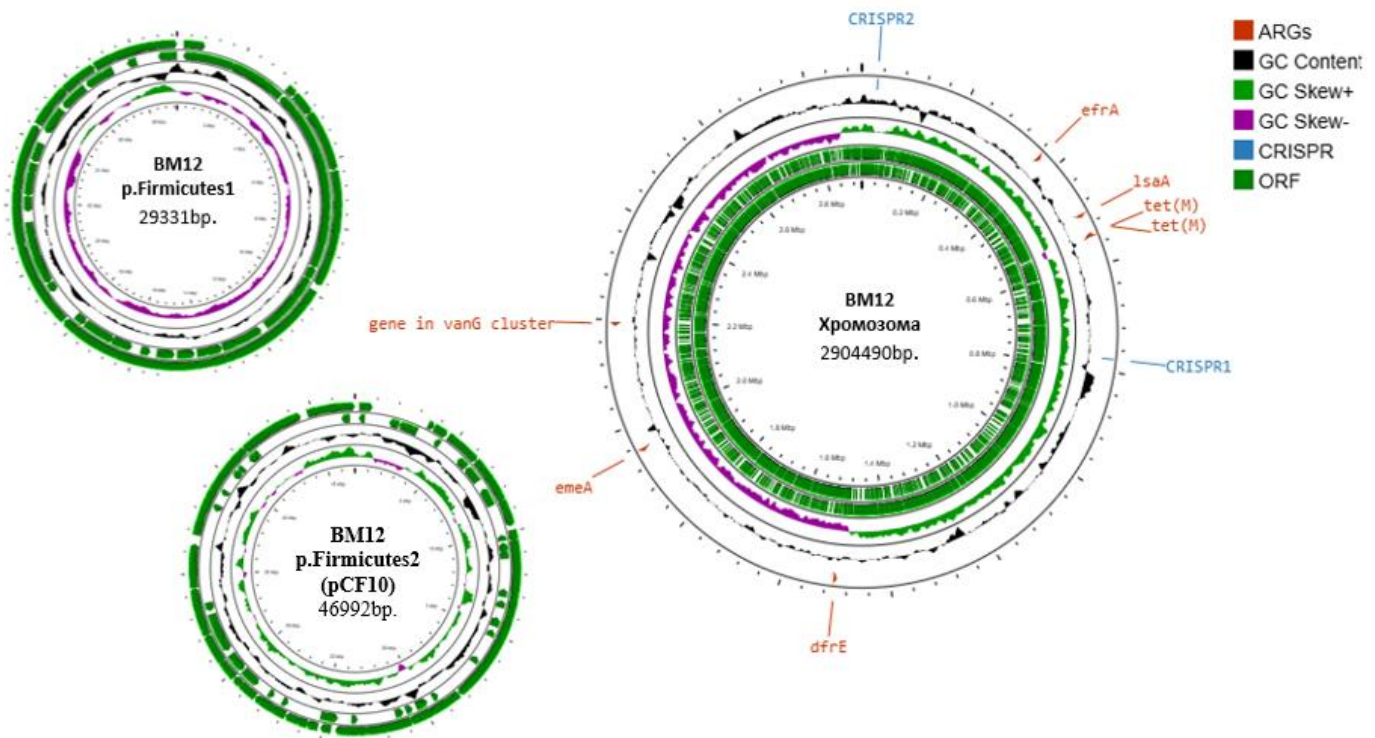
Приложение 1: Геномна карта на щам *E. faecalis* CM4, една хромозома и три плаزمиди. **Червен цвят**- гени за антибиотична резистентност, син цвят- CRISPR системи. Изображението е генерирано чрез Map Builder в Proksee софтуера, Версия 2.0.5. (<https://proksee.ca/>).



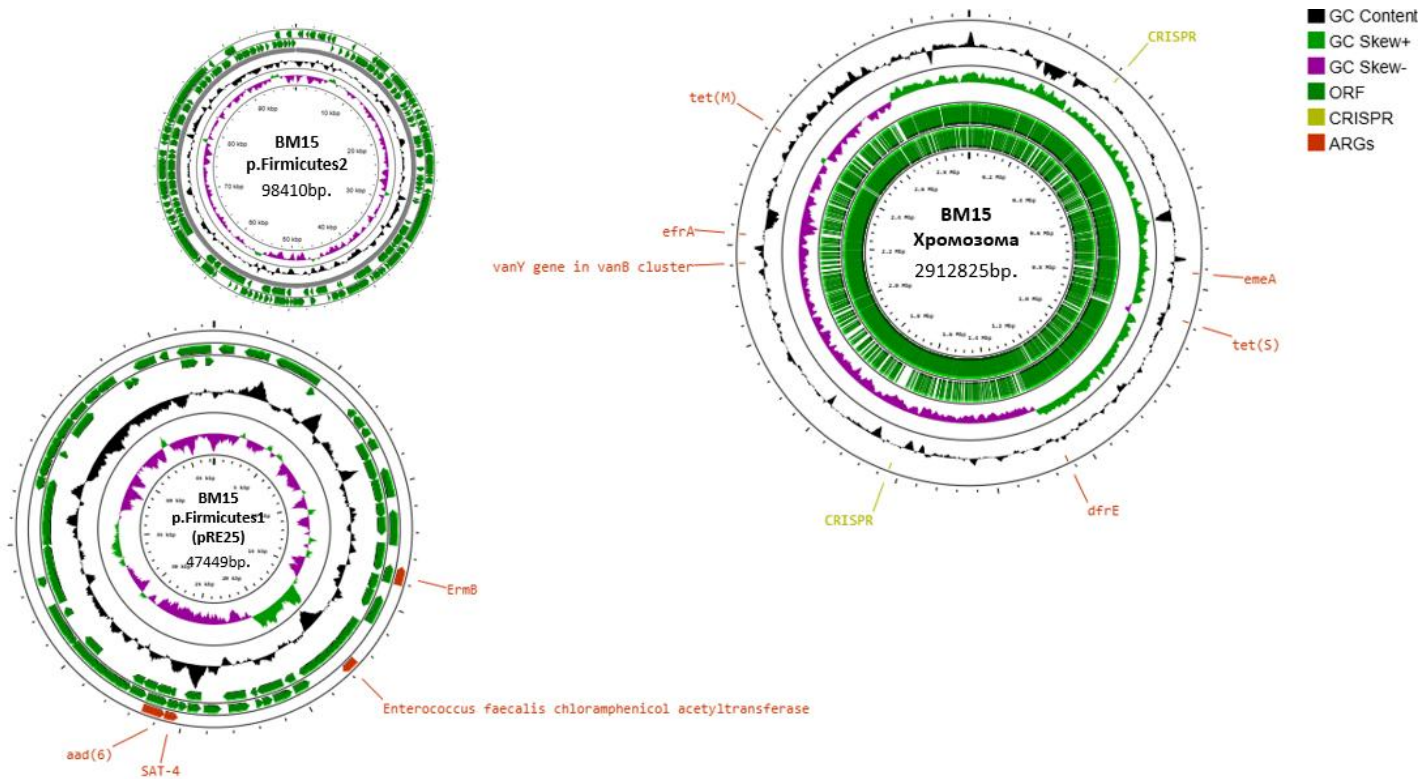
Приложение 2: Геномна карта на щам *E. faecalis* BM5, една хромозома и два плазмиди. Червен цвят- гени за антибиотична резистентност, син цвят- CRISPR системи. Изображението е генерирано чрез Map Builder в Proksee софтуера, Версия 2.0.5. (<https://proksee.ca/>).



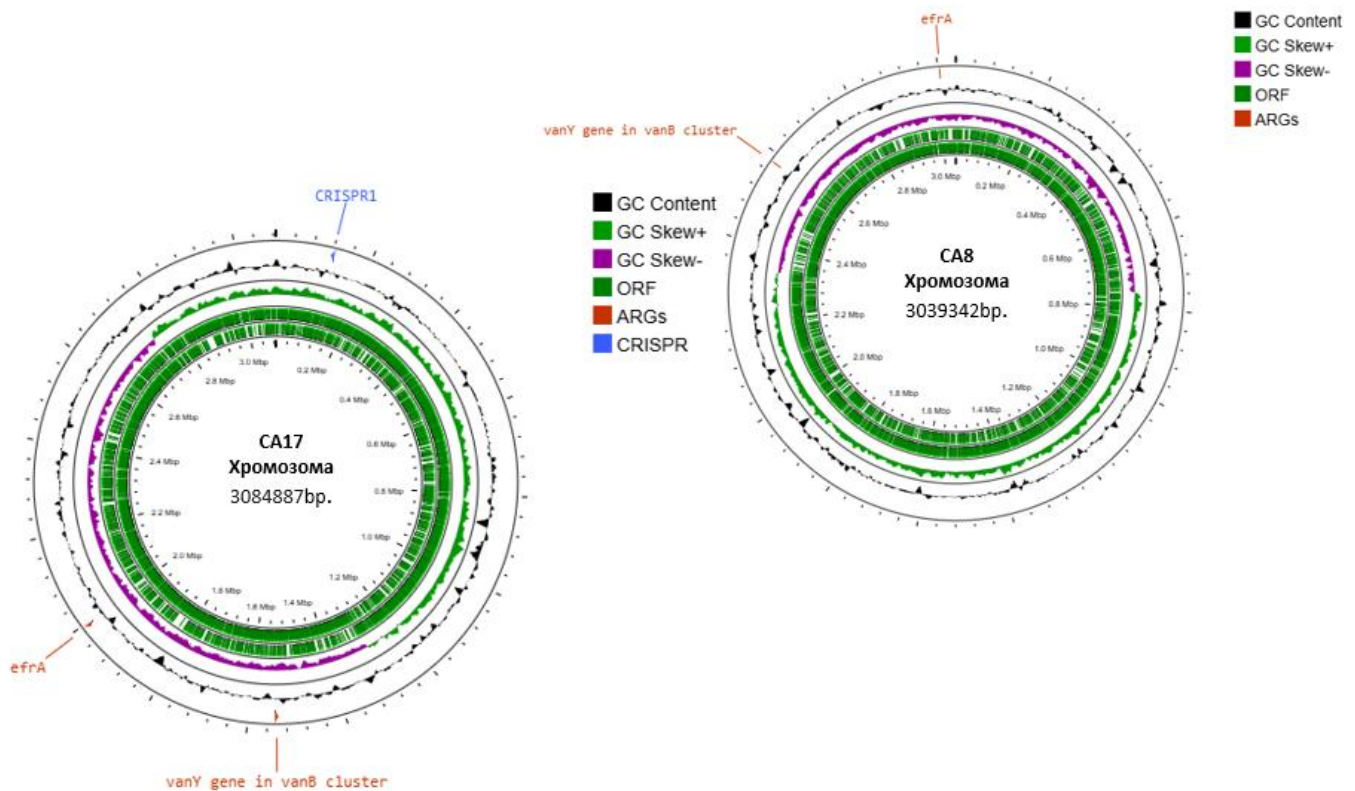
Приложение 3: Геномна карта на щам *E. faecalis* BM12, една хромозома и два плазмиди. **Червен цвят**- гени за антибиотична резистентност, син цвят- CRISPR системи. Изображението е генерирано чрез Map Builder в Proksee софтуера, Версия 2.0.5. (<https://proksee.ca/>).



Приложение 4: Геномна карта на щам *E. faecalis* BM15, една хромозома и два плаزمида. Червен цвят- гени за антибиотична резистентност, жълт цвят- CRISPR системи. Изображението е генерирано чрез Map Builder в Proksee софтуера, Версия 2.0.5. (<https://proksee.ca/>).



Приложение 5: Геномни карти на щамове *E. mundtii* CA8 и *E. mundtii* CA17. В щамовете са асемблирани единствено пълните кръгови хромозоми . Червен цвят- гени за антибиотична резистентност, син цвят- CRISPR системи. Изображението е генерирано чрез Map Builder в Proksee софтуера, Версия 2.0.5. (<https://proksee.ca/>).



Публикации, свързани с дисертационния труд

1. **Pandova, M.**; Kizheva, Y.; Hristova, P. Relationship Between CRISPR–Cas Systems and Acquisition of Tetracycline Resistance in Non-Clinical Enterococcus Populations in Bulgaria. *Antibiotics* **2025**, 14, 145. <https://doi.org/10.3390/antibiotics14020145>. Quartile: Q1. Online ISSN 2079-6382. IF: 4.3
2. **Pandova, M.**; Kizheva, Y.; Tsenova, M.; Rusinova, M.; Borisova, T.; Hristova, P. Pathogenic Potential and Antibiotic Susceptibility: A Comprehensive Study of Enterococci from Different Ecological Settings. *Pathogens* **2024**, 13, 36. <https://doi.org/10.3390/pathogens13010036>; Quartile: Q2. Online ISSN 2076-0817. IF: 3.3

Участие в научни форуми

Национални

1. **Мария Пандова**, Йоана Кижева, Петя Христова; „Ентерококите - на границата на полезното и вредното“, 120 години от откриването на *Lactobacillus bulgaricus*; 29/04-29/04 2025; София, България; Секционен доклад
2. **Maria Pandova**, Yoana Kizheva, Petia Hristova; “Phage – bacteria interactions as a model system for analysing CRISPR functionality in bacteria”, EATRIS-BULGARIA; 7/11-9/11 2024; Sofia, Bulgaria; Poster
3. Yoana Gladicheva, Yoana Kizheva, Zoltan Urshev, Melani Dimitrova, **Maria Pandova**, Petya Hristova; „Design of specific primers for detection and quantification of *Xantomonas euvesicatoria* specific bacteriophages“, Youth Scientific Conference 60 years Department “General and Industrial Microbiology”; 17/11-17/11 2023; Sofia, Bulgaria; Poster
4. Yoana Kizheva, Karina Stoilova, Maria Georgieva, Melani Dimitrova, **Maria Pandova**, Petya Hristova; „Distribution of genes encoding virulence factors among foodborne enterobacteria“, Youth Scientific Conference 60 years Department “General and Industrial Microbiology”; 17/11-17/11 2023, Sofia, Bulgaria; Poster
5. **Maria Pandova**, Yoana Kizheva, Iliyana Rasheva, Petya Hristova; „Functionality of CRISPR systems and antibiotic resistance gene transfer in enterococci from different origin“, Youth Scientific Conference 60 years Department “General and Industrial Microbiology”; 17/11-17/11 2023, Sofia, Bulgaria; Poster
6. Hristina Pavlova, **Maria Pandova**, Yoana Kizheva, Iliyana Rasheva, Petya Hristova; „Isolation and characterization of virulence factors in enterococci from breast milk“, Youth Scientific Conference 60 years Department “General and Industrial Microbiology”; 17/11-17/11 2023, Sofia, Bulgaria; Poster
7. Ralitsa Petrova, **Maria Pandova**, Yoana Kizheva, Petya Hristova; „Phytopathogenic potential of human cross-over pathogens in *Solanum lycopersicum* and *Capsicum annum*“, Youth Scientific Conference 60 years Department “General and Industrial Microbiology”; 17/11-17/11 2023, Sofia, Bulgaria; Poster

8. Yoana Kizheva, Maria Gurkova, Deyan Donchev, Melani Dimitrova, Desislava Pirnareva, **Maria Pandova**, Petya Hristova; “Solanaceous vegetables as reservoirs for survival and dispersal of phytopathogenic coryneform bacterium *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *Flaccumfaciens*”, Youth Scientific Conference 60 years Department “General and Industrial Microbiology”; 17/11-17/11 2023, Sofia, Bulgaria; Poster

Международни

1. **Maria Pandova**, Yoana Kizheva, Iliyana Rasheva, Petya Hristova, „Antibiotic resistance of enterococci with different origin“, XVth Congress of Microbiologists in Bulgaria; 05/10-08/10 2022, Koprivshtitsa, Bulgaria; Poster- Awarded second best poster
2. **Maria Pandova**, Yoana Kizheva, Iliyana Rasheva, Petya Hristova, „Virulence potential of enterococci isolates from non-hospital origin“, XVth Congress of Microbiologists in Bulgaria; 05/10-08/10 2022 , Koprivshtitsa, Bulgaria; Poster
3. Yoana Kizheva, Melani Dimitrova, Yoana Gladicheva, **Maria Pandova**, Zoltan Urshev, Iliyana Rasheva; „Targeted Phage Treatment (TPT) Of Tomato Seeds As Prophylactic Approach Against Bacterial Leaf Spot Disease Caused By *Xanthomonas Euvesicatoria*“, 6th World conference on Targeting Phage therapy; 01/06-02/06 2023; Paris, France

Участие в научни проекти

1. Синтез, антибактериална и антивирусна активност на камфор сулфонамиди и техни хидразонови производни. Дог. № КП-06-М-69/2-участник
2. Фенотипни и молекулярно-генетични проучвания на придобития имунитет при ентерококи и връзката му с антибиотичната им резистентност. Дог. №:80-10-123-участник
3. Изследване на адхезионните свойства на млечнокисели бактерии, изолирани от кърма и фецес на новородени. Дог. № 80-10-120 -участник
4. Микробиом и състав на кърма- ключови фактори, роля и взаимовръзка с оралната и чревна микробиота при новородени деца. Дог. № КП-06-Н61-9 -участник
5. Роля на паразитни растения от род *Cuscuta* като резервоари и вектори за разпространение на фитопатогенни бактерии. Дог. № КП-06-КОСТ/9 -участник