

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ

Институт по микробиология „Стефан Ангелов”, Департамент по Обща
микробиология, Секция „Микробна биохимия”

Стефан Андреас Енгибаров

**ПОЛУЧАВАНЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА НА НОВА НЕУРАМИНИДАЗА
ОТ *AEROMONAS CAVIAE* 40/02**

АВТОРЕФЕРАТ
на дисертационен труд

за присъждане на образователна и научна степен „Доктор”

Научен ръководител:

проф. д-р Игнат Абрашев, дбн

доц. д-р Радослав Абрашев

Професионално направление 4.3 „Биологични науки”
Научна специалност 01.06.12 „Микробиология”

София, 2019

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

ГМП	глюкомакропептид
ИФО	индофенол оксидаза
ФАД	фенилаланин-дезаминаза
OD	оптична плътност
ДЕАЕ целулоза	диетиламиноетил целулоза
SDS	натриев додецилфосфат
PAGE	полиакриламидна електрофореза
Rf	фактор на относителна подвижност
НЦЗПБ	Национален център по паразитни и заразни болести
A280	абсорбция при 280 nm
NB	Хранителна среда Nutrient broth
TSB	Хранителна среда Tryptic soy broth
TSA	Хранителна среда Tryptic soy agar
BHI	Хранителна среда Brain heart infusion
MUN	2'-(4-метилумбелиферил)- α -D-N-ацетилнеурамина киселина
BIN	5-бромо-4-хлор-3-индолил- α -d-N-ацетилнеурамина киселин
ЕДТА	етилендиаминтетраацетат

У В О Д

Неураминидазите са разнообразна група от ензими срещащи се при различни микроорганизми, някои безгръбначни, гръбначни и човек. Бактериите, продуциращи неураминидази, в повечето случаи са патогени или коменсали, т. е. микроорганизми намиращи се в тесен контакт с тъканите на гостоприемника. Бактериалните неураминидази изпълняват две основни функции. От една страна тези ензими улесняват проникването на патогена в гостоприемника участвайки в процеси на имunosупресия, образуване на биофилми и разкриване на крипторецептори. От друга страна, същите ензими имат основна роля в метаболизма на сиаловите киселини снабдявайки микроорганизмите с въглероден, азотен и енергиен източник и осигурявайки им определени преимущества в конкретните екологични ниши (стомашно-чревния и дихателния тракт на гостоприемника или околната среда). В тази връзка, изследването на тези ензими е важно от чисто медицинска гледна точка с цел по-доброто проучване ролята на неураминидазите в проявата на вирулентност и значението на ензима за патогенезата. Изследването на тези ензими е интересно и от чисто биохимичен аспект, тъй като засяга особеностите на сиаловия метаболизъм – един от важните моменти в обмяната на веществата при микроорганизмите.

Все по-нарастващото значение на неураминидазите за химическата индустрия и фармацевцията също обуславя повишения интерес към тези ензими. Прилагането им в получаването на сиализирани гликани позволява елиминирането на сложни химични синтетични процеси и скъпо струващи реактиви.

Големият брой патогенни бактерии, продуциращи неураминидаза стимулира учените да търсят нови продуценти на този ензим. Интересно е, че всеки патоген може да бъде потенциален „заподозрян“ в продуциране на неураминидаза. Това могат да бъдат както облигатни, така и опортюнистични патогени. При някои от тези бактерии има данни за неураминидазна продукция, но без конкретно изучаване свойствата на ензима. Едни такива бактерии са представителите на род *Aeromonas* – патогени при студенокръвни и топлокръвни животни и условни патогени при хората. При този род бактерии е регистрирано наличие на неураминидаза при някои щамове (Vertiev et al., 1978; Kabir et al., 1984; Abrashev et al. 2006; Orozova et al., 2007), но отсъстват каквито и да е биохимични изследвания върху ензима. Считаме, че това дава основание за провеждане на проучвания, касаещи биохимичните особености на ензима неураминидаза от представител на род *Aeromonas*. Настоящата разработка се явява първо по рода си изследване, засягащо изолирането, пречистването и биохимичното характеризиране на неураминидаза от този род микроорганизми. Обект на изследването е щам *Aeromonas caviae* 40/02.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия дисертационен труд е проучване на продукцията и биохимична характеристика на ензима неураминидаза от щам *Aeromonas caviae* 40/02.

За реализиране на тази цел бяха формулирани следните задачи:

1. Изследване на продукцията на неураминидаза при изолати на *Aeromonas*
2. Таксономична, морфологична, физиологична и биохимична характеристика на подходящ щам продуцент на неураминидаза.
3. Оптимизиране на условията за продукция на извънклетъчна неураминидаза от щам *A. caviae* 40/02
4. Проучване ефекта на индуктори върху синтеза на ензима
5. Изследване продукцията на извънклетъчна неураминидаза във връзка с растежните фази на щам *A. caviae* A40/02
6. Изолиране и пречистване на ензима
7. Изследване влиянието на физикохимичните фактори температура и рН върху ензимното действие
8. Проучване въздействието на метални йони и химични съединения върху действието на неураминидаза от щам *A. caviae* A40/02
9. Проучване на субстратната специфичност на ензима

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Материали

1.1. Щамове

Изследвана е извънклетъчната неураминидазна активност на 40 изолата, определени като *Aeromonas* spp., и предоставени от колекцията на Националния център по заразни и паразитни болести (НЦЗПБ). Изолатите са получени от пациенти, здрави хора, водоизточници от околна среда и питейна вода, както и от месо. Изолатите са култивирани статично, в Хотингеров бульон на 30°C, като неураминидазната активност е отчетана на 24-ти и 48-ми час.

1.2. Хранителни среди

При изследванията са използвани следните хранителни среди:

1. Nutrient broth (NB),
2. Tryptic soy broth (TSB), Tryptic soy agar (TSA),
3. Brain heart infusion broth (BHI),
4. Хотингеров бульон,
5. Полусинтетична хранителна среда за индукция,
6. Среда за Конго-ред,
7. Среда за протеолитична активност,
8. Среда за пиразинамидазна активност

1.3. Съединения, изпитвани за индуциращо действие

- | | |
|-----------------------|--------------------|
| – N-ацетилманозамин | – Сиалова киселина |
| – N-ацетилглюкозамин | – Трансферин |
| – ГМП | – Фетуин |
| – Казаминови киселини | |

1.4. Субстрати за неураминидазна активност

- Конски серум (Sigma-Aldrich),
- Говежди трансферин (ICN Biochemicals Inc.),
- Човешки трансферин (Miles Laboratories, Inc),
- Фетуин (Koch-Light Laboratories Ltd),
- Орозомукоид (Sigma Chemical Company),
- Коломинова киселина (Koch-Light Laboratories Ltd.),
- Глюкомакропептид (получен в нашата лаборатория по метода на Abrashev et al., 1980).

1.5. Метални йони и химични съединения, изпитвани за влияние върху ензимната активност

В изследването са използвани следните метални соли в концентрация от 40mM: CoCl_2 , CuCl_2 , BaCl_2 , Li_2SO_4 , MgCl_2 , FeCl_3 , CdCl_2 , NiSO_4 , NaCl , FeSO_4 , HgI_2 , ZnSO_4 , CaCl_2 , KCl , MnSO_4 , $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})$. В експериментите са използвани и следните химични съединения, изследвани за инхибиращо действие в крайни концентрации от 1 и 10 mM: ЕДТА (натриева сол), натриев арсенит (SH-инхибитор), L-аскорбинова киселина, глутатион и цистеин (тиолови агенти), тиосемикарбазид и хидразин хидрохлорид (инхибитори на карбонилни групи), N-бромосукцинимид и водороден прекис (оксидиращи агенти), натриев флуороацетат и натриев азид. Всички реактиви без водородния пероксид (Химспектър, България) са получени от Sigma-Aldrich.

2. По-важни методи използвани в дисертацията

2.1. Генетични методи

Използва се PCR анализ, като амплификацията на 16S рибозомалния ген е извършена с помощта на Fusion High-Fidelity Master Mix (Thermo Fisher Scientific Inc.). PCR е проведен в QB-96 Satellite Gradient Thermal Cycler (LKB Vertriebs GmbH, Vienna, Austria). Секвенирането на получените PCR фрагменти е извършено в Macrogen Inc. (Amsterdam, The Netherlands), с последващ секвенционен анализ с помощта на програмите Chromas LITE, версия 2.1 и CAP3. Сравняването с данните от GenBank е осъществено чрез програмите BLAST и ClustalW. Секвенцията е депозирана в базата данни на NCBI Genbank под номер MG028636.

2.2. Микробиологични методи

- Отчитане растежа на културите (OD_{600})
- Светлинно-оптична микроскопия
- Метод на пъстрата редица за идентификация на щама
- Vitek 2 анализ
- Оцветяване по Конго-ред
- Отчитане на пиразинамидазна и протеолитична активност
- Чувствителност на щама към антимикробни съединения
- Установяване на оптимални условия за култивиране на щама (статично, аеробно, при 30°C, върху среда ВНІ)
- Установяване връзката между растежните фази и продукцията на ензима

2.3. Биохимични методи

- Определяне на неураминидазна активност по метода на Aminoff (1961), модифициран от Uchida et al. (1977).
- Определяне на N-ацетилнеураминат-лиазна (алдолазна) активност.
- Определяне на белтък по Lowry (1953).
- Пречистване на ензимния препарат чрез ултрафилтрация през мембрана PM 100 kDa, изсолване с амониев сулфат (60% насищане) и йонообменна хроматография с ДЕАЕ целулоза.
- Оценяване чистотата на ензимния препарат чрез използване на нативна PAGE и SDS-PAGE.
- Определяне на температурния и рН-оптимум на ензима.
- Определяне влиянието на метални йони и инхибитори върху ензимната активност.
- Установяване на субстратната специфичност на ензима.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Изследване на изолати *Aeromonas spp.* за неураминидазна активност и избор на щам продуцент

Получените от НЦЗПБ и определени като *Aeromonas* изолати (40 на брой) са изследвани за наличие на извънклетъчна неураминидазна активност. Изолатите са събирани както от здрави хора и пациенти, така и от околна среда (речна вода), питейна вода и месо. При някои от тези изолати е регистрирана извънклетъчна неураминидазна активност (Табл. 1). Не се забелязва връзка между източника, от който са получени аеромонасите и наличието на изследваната ензимна активност. При някои от бактериите, независимо дали са получени от здрави хора или пациенти, неураминидазна активност се регистрира на 48-ия час, като стойностите варират от 0.6 – 0.8 U/ml (изолати от здрави хора) и 2.85-2.9 U/ml (изолат от пациент). Повечето изолати проявяват ензимна активност на 24 - ия час, като тя се засилва на 48 – ия час.

Таблица 1. Извънклетъчна неураминидазна активност в изолати от род *Aeromonas*

Източник на изолатите	Брой изолати*	Неураминидазна активност, (U/ml)	
		24 час	48 час
здрав човек	2	-	0.6-0.8
здрав човек	7	0.9-2.0	0.9-3.0
здрав човек	2	2.0-3.0	2.0-3.8
здрав човек	2	0.3-0.6	2.5-3.8
пациент	1	-	2.85-2.9
пациент	5	0.6-2.0	1.9-3.5
речна вода	4	1.5-2.7	2.5-2.8
речна вода	1	3.1-3.2	5.5-5.6
питейна вода	3	0.6-1.3	1.8-2.8
месо	2	2.9-3.0	2.6-2.75

*Групираны според стойностите на ензимната активност

Един от изолатите, изолиран от речна вода и означен като А40/02, се откроява с по-високата си активност. На 24-ия час се отчита около 3 U/ml, докато на 48-ия час активността нараства до 5.5 U/ml. Всички следващи експерименти са проведени с този микроорганизъм.

2. Характеристика на изолат А40/02

2.1. Определяне видовата принадлежност на бактериален изолат А40/02 чрез PCR-амплификация и секвенционен анализ.

След проведенят PCR-анализ и последващо секвениране на 16S рДНК фрагменти, идентифицирани в изолат А40/02 е получена нуклеотидна секвенция, представена на Фиг.1.

```
1 tcgaagtcga gcggcagcgg gaaagtagct tgctactttt gccggcgagc ggcggacggg
61 tgagtaatgc ctgggaaatt gcccaagtcga gggggataac agttggaaac gactgctaat
121 accgcatacg ccctacgggg gaaagcaggg gaccttcggg ccttgccgca ttgatatgc
181 ccagggtggga ttagctagt ttgtgaggtaa tggctacca aggcgacgat ccctagctgg
241 tctgagagga tgatcagcca cactggaact gagacacggt ccagactcct acgggaggca
301 gcagtgggga atattgcaca atgggggaaa ccctgatgca gccatgccgc gtgtgtgaag
361 aaggccctcg gttgtaaag cactttcagc gaggaggaaa ggtcagtagc taatatctgc
421 tgctgtgac gttactcgca gaagaagcac cggctaactc cgtgccagca gcccggttaa
481 tacggagggg gcaagcgtta atcgaatta ctgggcgtaa agcgcacgca ggcggttggg
541 taagtaagat gtgaagccc cgggctcaac ctgggaattg catttaaac tgtccagcta
601 gagtcttga gaggggggta gaattccagg ttagcgggtg aatgcgtag agatctggag
661 gaataccggt ggcgaaagcg gcccctgga caaagactga cgctcaggtg cgaagcgtg
721 gggagcaaac aggattagat accctgtag tccacgccgt aaacgatgc gatttgaag
781 ctgtgcctt gagacgtggc tccggagct aacgcgtta atcgaccgc tggggagtac
841 ggccgcaagg taaaactca aatgaattga cgggggcccg cacaagcggg ggagcatgtg
901 gtttaattcg atgcaacgcg aagaacctta cctggccttg acatgtctgg aatcctcag
961 agatgcggga gtgcctcgg gaatcagaac acaggtgctg catggctgic gtcagctcgt
1021 gtcgtgagat gttgggttaa gtcccgaac gagcgcaacc cctgtccttt gttgccagca
1081 cgtaatgggt ggaactcaag ggagactgcc ggtgataaac cggaggaagg tggggatgac
1141 gtaagtcat catggccctt acggccaggg ctacacacgt gctacaatgg cgcgtacaga
1201 gggctgcaag ctagcagatg tagcgaatc ccaaaaagcg cgtcgtagtc cggattggag
1261 tctgcaactc gactccatga agtcggaatc gctagtaate gcaaatcaga atgttgcggt
1321 gaatacgttc ccgggccttg tacacaccgc ccgtcacacc atgggagtggt gttgcaccag
1381 aagtagatag cttaac
```

Фиг. 1. Нуклеотидна последователност на 16S рибозомалния ген на изолат А40/02

Впоследствие, чрез BLAST - анализ е проведено сравняване на получената секвенция с подобни секвенции, идентифицирани при типови щамове *A. caviae* strain ATCC 15468 (NR 029252) и *Aeromonas enteropelogenes* strain ATCC 49803 (NR 116026). Установено е 99.7851% сходство с типовия щам *A. caviae* и 99.7135% сходство с *A. enteropelogenes* (Фиг. 2 и Табл. 2).

```

ATCC_15468      CGAGCGGCAGCGGGAAAGTAGCTTGTACTTTTGCCGGCAGCGCGGACGGGTGAGTAA
ATCC_49803      CGAGCGGCAGCGGGAAAGTAGCTTGTACTTTTGCCGGCAGCGCGGACGGGTGAGTAA
AC_40/02        CGAGCGGCAGCGGGAAAGTAGCTTGTACTTTTGCCGGCAGCGCGGACGGGTGAGTAA
*****
ATCC_15468      TGCCTGGGAAATGCCCAGTCGAGGGGGATAACAGTTGGAACGACTGCTAATACCGCAT
ATCC_49803      TGCCTGGGAAATGCCCAGTCGAGGGGGATAACAGTTGGAACGACTGCTAATACCGCAT
AC_40/02        TGCCTGGGAAATGCCCAGTCGAGGGGGATAACAGTTGGAACGACTGCTAATACCGCAT
*****
ATCC_15468      ACGCCCTACGGGGAAAGCAGGGGACCTTCGGCCTTGC CGCATTTGGATATGCCAGGTG
ATCC_49803      ACGCCCTACGGGGAAAGCAGGGGACCTTCGGCCTTGC CGCATTTGGATATGCCAGGTG
AC_40/02        ACGCCCTACGGGGAAAGCAGGGGACCTTCGGCCTTGC CGCATTTGGATATGCCAGGTG
*****
ATCC_15468      GGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGA
ATCC_49803      GGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGA
AC_40/02        GGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGA
*****
ATCC_15468      GGATGATCAGCCACACTGGAAC TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGG
ATCC_49803      GGATGATCAGCCACACTGGAAC TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGG
AC_40/02        GGATGATCAGCCACACTGGAAC TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGG
*****
ATCC_15468      GGAATATGCAACAATGGGGAAACCC TGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCC
ATCC_49803      GGAATATGCAACAATGGGGAAACCC TGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCC
AC_40/02        GGAATATGCAACAATGGGGAAACCC TGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCC
*****
ATCC_15468      TCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGAGGAGAAAGGT CAGTAGCTAATATCTGCTGGCTGT
ATCC_49803      TCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGAGGAGAAAGGT CAGTAGCTAATATCTGCTGGCTGT
AC_40/02        TCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGAGGAGAAAGGT CAGTAGCTAATATCTGCTGGCTGT
*****
ATCC_15468      GACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCG TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAG
ATCC_49803      GACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCG TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAG
AC_40/02        GACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCG TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAG
*****
ATCC_15468      GGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGCGGTTGGATAAGTTA
ATCC_49803      GGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGCGGTTGGATAAGTTA
AC_40/02        GGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGCGGTTGGATAAGTTA
*****
ATCC_15468      GATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAATTGCATT TAAAAGTGTCCAGCTAGAGTCTT
ATCC_49803      GATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAATTGCATT TAAAAGTGTCCAGCTAGAGTCTT
AC_40/02        GATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAATTGCATT TAAAAGTGTCCAGCTAGAGTCTT
*****
ATCC_15468      GTAGAGGGGGGTAGAAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGT TAGAGATCTGGAGGAATACC
ATCC_49803      GTAGAGGGGGGTAGAAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGT TAGAGATCTGGAGGAATACC
AC_40/02        GTAGAGGGGGGTAGAAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGT TAGAGATCTGGAGGAATACC
*****
ATCC_15468      GGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCA
ATCC_49803      GGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCA
AC_40/02        GGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCA
*****
ATCC_15468      AACAGGATTAGATACCTTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCGATTGGAGGCTGTGTC
ATCC_49803      AACAGGATTAGATACCTTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCGATTGGAGGCTGTGTC
AC_40/02        AACAGGATTAGATACCTTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCGATTGGAGGCTGTGTC
*****
ATCC_15468      CTTGAGACGTGGCTTCCGGAGCTAACCGGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCA
ATCC_49803      CTTGAGACGTGGCTTCCGGAGCTAACCGGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCA
AC_40/02        CTTGAGACGTGGCTTCCGGAGCTAACCGGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCA

```

```

*****
ATCC_15468 AGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT
ATCC_49803 AGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT
AC_40/02 AGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT
*****
ATCC_15468 TCGATGCAACCGGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGTCTGGAATCCTGCAGAGATGCG
ATCC_49803 TCGATGCAACCGGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGTCTGGAATCCTGCAGAGATGCG
AC_40/02 TCGATGCAACCGGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGTCTGGAATCCTGCAGAGATGCG
*****
ATCC_15468 GGAGTGCCTTCGGGAATCAGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTCTGTA
ATCC_49803 GGAGTGCCTTCGGGAATCAGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTCTGTA
AC_40/02 GGAGTGCCTTCGGGAATCAGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTCTGTA
*****
ATCC_15468 GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCTTTGTTGCCAGCACGTAATG
ATCC_49803 GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCTTTGTTGCCAGCACGTAATG
AC_40/02 GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCTTTGTTGCCAGCACGTAATG
*****
ATCC_15468 GTGGGAACCTCAAGGGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGT
ATCC_49803 GTGGGAACCTCAAGGGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGT
AC_40/02 GTGGGAACCTCAAGGGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGT
*****
ATCC_15468 CATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTACAGAGGGCTGC
ATCC_49803 CATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTACAGAGGGCTGC
AC_40/02 CATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTACAGAGGGCTGC
*****
ATCC_15468 AAGCTAGCGATAGTGAGCGAATCCCAAAAAGCGCGTCTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAA
ATCC_49803 AAGCTAGCGATAGTGAGCGAATCCCAAAAAGCGCGTCTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAA
AC_40/02 AAGCTAGCGATAGTGAGCGAATCCCAAAAAGCGCGTCTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAA
*****
ATCC_15468 CTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAAATCAGAATGTGCGGTGAATACG
ATCC_49803 CTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAAATCAGAATGTGCGGTGAATACG
AC_40/02 CTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAAATCAGAATGTGCGGTGAATACG
*****
ATCC_15468 TTCCCGGCCTTGTTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGA
ATCC_49803 TTCCCGGCCTTGTTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGA
AC_40/02 TTCCCGGCCTTGTTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGA
*****
ATCC_15468 TAGCTTAACCTTCGGGAGGG-----
ATCC_49803 TAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTACCACGGTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTA
AC_40/02 TAGCTTAAC-----
*****

```

Фиг. 2. Сравнение на 16S рибозомалния ген на новия изолат A40/02 с типови щамове *A. caviae* strain ATCC 15468 (NR 029252) и *A. enteropelogenes* strain ATCC 49803 (NR 116026)

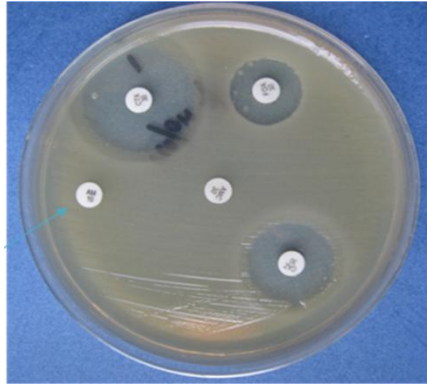
Таблица 2. Хомология с *A. caviae* ATCC 15468 - 99.7851% . Хомология с *A. enteropelogenes* ATCC 49803 - 99.7135%

Щам	Подобие на секвенцията на 16S гена с тази на <i>Aeromonas sp.</i> 40/02
<i>Aeromonas caviae</i> ATCC 15468	99.7851 %
<i>A. enteropelogenes</i> ATCC 49803	99.7135 %

Характерна особеност на *A. enteropelogenes* е чувствителността му към ампицилин, докато антибиограмата на изолат A40/02 показва резистентност към

този антибиотик (Фиг. 3). Данните от анализа на 16S рибозомалния ген и антибиограмата показват принадлежността на изолат А40/02 към вида *A. caviae*.

Получената секвенция е депозирана в базата данни на NCBI Genbank под номер MG028636.

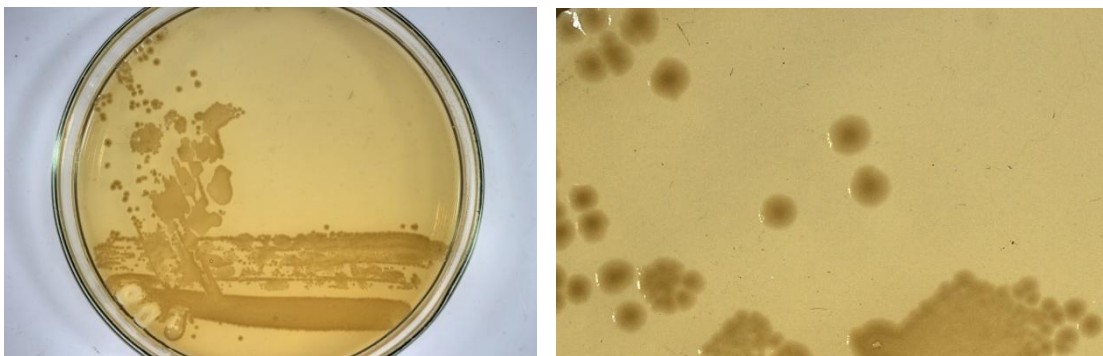


Фиг. 3. Резистентност на изолат А40/02 към ампицилин

2.2. Морфологична характеристика на щам-продуцент

2.2.1. Морфология на колонии

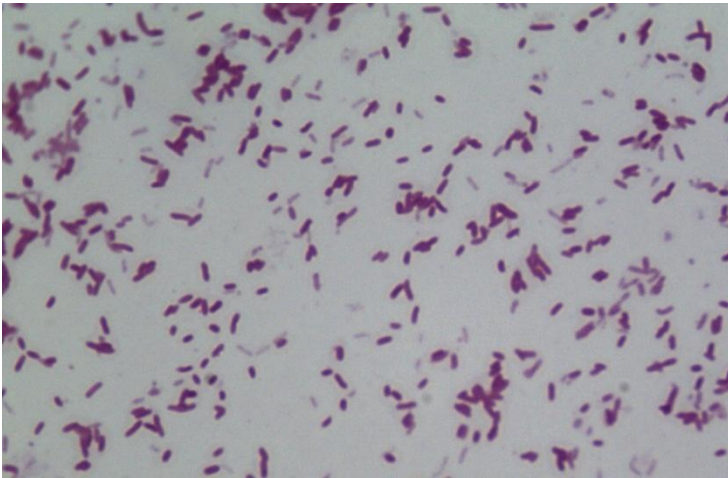
На 48-ия час от култивирането на щам-продуцента са отчетени следните морфологични особености: колонии са матови, равномерно оцветени с грапава повърхност. Най-външната периферна част е обхваната от много тънък и плосък пръстен опасващ колонията. Няма ясно изразен връх. Размери на колонията: 1.5-2.0 мм (Фиг. 4.).



Фиг. 4. Единични колонии на щам *A. caviae* А 40/02 култивиран върху TSA - А: увеличение 5x; Б: увеличение 20x

2.2.2. Светлинно-микроскопско наблюдение на щама-продуцент.

Наблюдението под светлинен микроскоп демонстрира характерната за род *Aeromonas* картина. Клетките са пръчковидни, до коковидни, със заоблени краища, с размери 1.0-3.5 μm дължина и 0.3-1.0 μm диаметър (Фиг. 5).



Фиг. 5. Микроскопска картина на щам *A. caviae* A40/02 на 18-ти час. Оцветяване с карболгенцианвиолет, увеличение 1000 х.

2.3. Физиологична и биохимична характеристика на щама-продуцент

2.3.1. Чрез метода на пъстрата редица са проучени физиологичните свойства на щама като способност за усвояване на захари, аминокиселини, продуциране на определени ензими и др. (Табл. 3). Щамът усвоява захарите глюкоза, малтоза и захароза, като ферментацията на глюкоза протича без отделяне на газ, което е и характерна особеност на *A. caviae* (Carnahan et al., 1991; Janda and Abbot, 2010; Igbinosa et al., 2012). Образуването на индол е белег за наличието на ензима триптофаназа, който разгражда триптофана до индол, пирогроздена киселина и амоняк (MacFaddin, 1980). По отношение на аминокиселините, щамът не е в състояние да декарбоксилира лизин и орнитин и не подлага на дезаминиране фенилаланина, но затова пък усвоява аргинин. Положителният резултат по Симонс цитрат означава, че A40/02 може да използва цитрата като единствен въглероден и енергиен източник, докато отрицателният тест по реакцията на Voges Proskauer подсказва, че ферментацията на глюкоза протича без образуването на ацетилметилкарбинол. Щамът не усвоява лактоза и не отделя H_2S от цистеин. Последният факт е характерна

особеност на повечето представители на *A. caviae* (Carnahan et al., 1991; Janda and Abbot, 2010; Igbinosa et al., 2012).

Таблица 3. Физиологична характеристика на щам *A. caviae* 40/02

Тест	Резултат	Тест	Резултат
ИФО	+	Лизин	-
Глюкоза	+ (без газ)	Орнитин	-
Манитол	+	Аргинин	+
Малтоза	+	Дулцитол	-
Захароза	+	Симонс цитрат	+
Лактоза	-	ФАД	-
Индол	+	Уреаза	-
H ₂ S	-	Voges Proskauer	-

2.3.2. Някои ключови биохимични особености са установени и чрез използване на автоматизираната система за анализ VITEK 2 (Табл. 4).

От представените данни в Таблицы 3 и 4 става ясно, че щам *A. caviae* A40/02 проявява като цяло характерните за рода биохимични особености. Три важни белези на аеромонасите (наличие на оксидаза, усвояване на глюкоза, отрицателен тест по уреаза, резистентност към вибриостатичния агент O/129) са отличителни особености и на щама-продуцент. Щамът проявява и някои общи за подвижните аеромонаси характеристики, като усвояването на манитол, трехалоза и L-малат, както и липсата на фенилаланин дезаминаза и орнитин декарбоксилаза.

Щам *A. caviae* A40/02 е регистриран в Националната банка за промишлени микроорганизми и клетъчни култури под номер 8715 (www.nbimcc.org).

Таблица 4. Биохимични особености на щам *A. caviae* A40/02 изследвани чрез VITEK 2 анализ

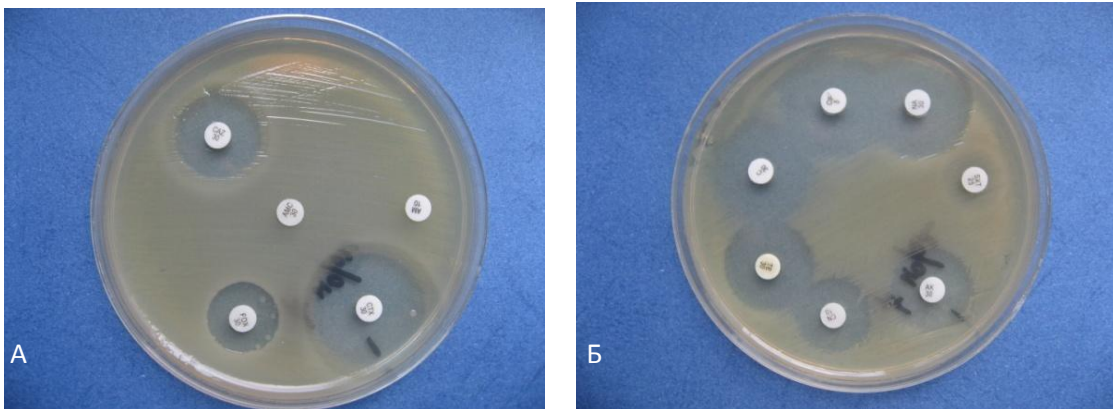
Тест	Резултат
Ala-Phe-Pro-ариламидаза	+
Адонитол	-
Бета-глюкозидаза	+
L-пролин ариламидаза	+
L-лактат алкализация	+
Глицин ариламидаза	+
O/129 резистентност	+
Адонитол	-
Бета-N-ацетил-глюкозаминидаза	+
Липаза	+
D-тагатоза	-
Алфа-глюкозидаза	-
Glu-Gly-Arg ариламидаза	+
L-пиролидонил ариламидаза	-
Глутамил ариламидаза рNA	-
Палатиноза	-
D-трехалоза	+
Сукцинат алкализация	+
L-малат асимилация	+
L-арабитол	-
D-маноза	-
Тирозин ариламидаза	+
Цитрат (натриев)	+
Бета-N-ацетил галактозаминидаза	+
L-хистидин асимилация	-
ЕЛМАН	+
D-целобиоза	+
Гама-глутамил-трансфераза	+
Бета-ксилозидаза	-
Малонат	-
Алфа-галактозидаза	-
Кумарат	+
L-лактат асимилация	-
Бета-галактозидаза	+
Бета-аланин ариламидаза	-
D-сорбитол	-
5-кето-D-глюконат	-
Фосфатаза	-
Бета-глюкоронидаза	-

2.3.3. Чувствителност на щам *A. caviae* A40/02 към антимикробни съединения

Резултатите за влиянието на различни антимикробни съединения са представени в Табл. 5. и Фиг. 6. Доказаната чувствителност на щама към амикацин, ципрофлоксацин, гентамицин, тетрациклин, налидиксова киселина е относително характерна за род *Aeromonas*, така както и устойчивостта към ампицилин и амоксицилин/клавуланова киселина. По отношение на ампицилина и повечето β -лактами, аеромонасите проявяват устойчивост свързана със синтеза на ензима бета-лактамаза. Установената в настоящето изследване резистентност на щам *A. caviae* A40/02 към триметоприм/сулфаметоксазол е по-рядко срещана, тъй като повечето аеромонаси са чувствителни към тази комбинация (Goni-Urriza et al., 2000; Huddleston et al., 2006; Aravena-Roman et al., 2012, Igbinosa, 2014). Едновременната устойчивост към три от антибиотичните комбинации е сигнал за възможен здравен риск. Макар и изолиран от речна вода, щамът може да има клиничен произход или да е придобил резистентност чрез генен трансфер, факт, наблюдаван при други представители на *Aeromonas* (De Paola et al., 1988; Huddleston et al., 2006).

Таблица 5. Чувствителност на щам *A. caviae* A40/02 към антимикробни съединения

Антимикробно средство	Чувствителност	Антимикробно средство	Чувствителност
Ampicillin (AM)	R	Chloramphenicol (C)	S
Amoxicillin/clavulanic acid (AMC)	R	Ciprofloxacin (Cip)	S
Amikacin (AK)	S	Gentamicin (CN)	S
Cefotaxime (CTX)	S	Nalidixic acid (NA)	S
Cefoxitin (FOX)	S	Tetracyclin (TE)	S
Ceftazidime (CAZ)	S	Trimethoprim sulfamethoxazole (SXT)	R

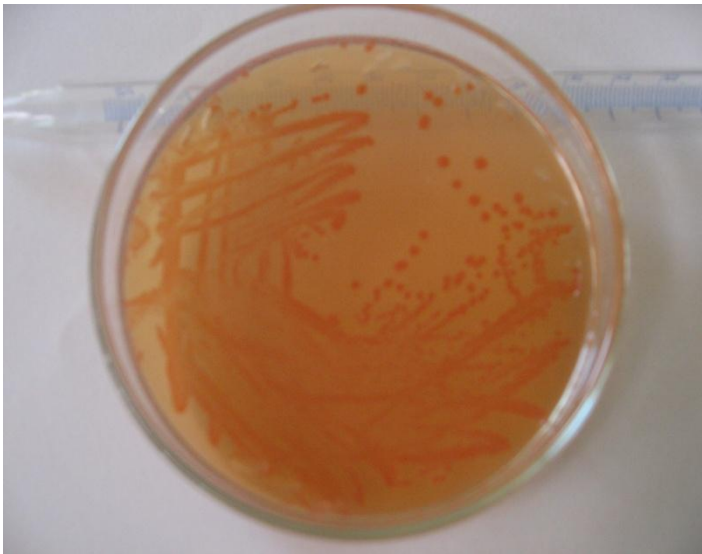


Фиг. 6. Антибиограма на щам *A. caviae* A40/02: А: чувствителност към АМ, АМС, АМ, FOX, СТХ; Б: чувствителност към АК, С, Сip, CN, NA, TE, STX.

2.3.4. Тест за оцветяване на колонииите с Конго-червено

Нашите опити доказват, че щам *A. caviae* A40/02 усвоява багрилото Конго-червено. Интересно е, че при визуален оглед на бактериалния налеп след 24-часово култивиране при 37°C, не се забелязва видима промяна на цвета. След 48-часово култивиране, вече се наблюдава характерното червеникаво оцветяване, което е ясен белег, че клетките на щамата усвояват багрилото (Фиг. 7). За интензивността на процеса се съди по цвета. Светло оранжев или червен цвят подсказва за усилено усвояване, докато бледо оранжевият цвят е белег за слабо или умерено натрупване на багрилото. В този смисъл щам *A. caviae* A40/02 се характеризира с добра способност за усвояване на багрилото Конго-червено. Подобна физиологична особеност на аеромонасите е наблюдавана и от други автори (Statner and George, 1987; Castro-Escarpulli et al., 2003; Orozova et al., 2007). Интересно е, че вирулентността на ентеропатогени като *Yersinia*, *V. cholerae*, *Shigella* корелира със способността им да усвояват Конго-червено (Prpic et al., 1983; Payne and Finkelstein, 1977; Maurelli et al., 1984). При някои представители на *Aeromonas* тази способност също се обвързва с тяхната

патогенност. При *A. salmonicida* е установено, че багрилото се свързва с повърхностно разположен белтък, който има участие в патогенния процес (Ishiguro et al., 1985). От друга страна, интензивно оцветяване с Конго-червено е наблюдавано и при колонии на невирулентни аеромонаси (Paniagua et al., 1990). При това положение се приема, че усвояването на багрилото не може да бъде точен вирулентен маркер при *Aeromonas* за разлика от други патогенни бактерии.



Фиг. 7. Усвояване на багрилото Конго-червено от 48-часова култура на щам *A. caviae* A40/02

2.3.5. Пиразинамидазна активност на щам *A. caviae* A40/02

Нашите експерименти доказват наличието на ензима пиразинамидаза при щам-продуцент *A. caviae* A40/02. След 48-часово култивиране при 37°C, културите развили се върху полегат агар се заливат с прясно приготвен 1% разтвор на амониево-железен сулфат. Започва постепенна промяна на цвета на бактериалната култура и агара, като се преминава през бледо розово до червеникаво оцветяване. След около 15 минути оцветяването достига своя максимум и се стабилизира. Една от епруветките не се залива и служи като

контрола за по-добро онагледяване на резултата (Фиг. 8). Счита се, че положителната пиразинамидазна активност може да се използва като фенотипен маркер за *A. caviae*, различаващ го, например от *A. veronii* bv. *sobria* (Erdem et al., 2010).

Отсъствието на този ензим е характерен белег за онези представители на *Aeromonas*, които се отличават с висока вирулентност. Предполага се, че липсата на този ензим е свързана по някакъв начин с патогенността, като естеството на тази връзка не е достатъчно изяснено. Възможно е отрицателната пиразинамидазна активност да е свързана с даден плазмид или друг, все още неизяснен фактор на патогенност (Carnahan et al., 1990).



Фиг. 8. Положителна пиразинамидазна активност на щам *A. caviae* A40/02 с характерното червеникаво оцветяване (епруветките вдясно). Епруветката вляво е контрола.

2.3.6. Протеолитична активност на щам *A. caviae* A40/02

Протеолитична активност е отчетена още на 24-ия час при култивиране върху казеинова среда, като зоните на просветление нарастват с течение на

времето (Фиг. 9). За сравнение, паралелно в същото петри е култивиран таксономично близкия микроорганизъм *V. cholerae* non O1/13, при който едва забележима зона на разграждане на казеина се наблюдава на 48-ия и по-отчетлива на 72-ия час. Резултатите относно щам *A. caviae* A40/02 намират потвърждение и в литературата. При повечето представители на *Aeromonas*, зони на разграждане се наблюдават още на 24-ия час, като са рядкост щамовете, при които протеолитична активност е отчетена на по-късен етап от култивирането или изобщо липсва такава (Zacaria J. et al., 2010).



Фиг. 9. Протеолитична активност на щамове-продуценти на неураминидаза *A. caviae* 40/02 (ляв щрих) и *V. cholerae* non-O1/13 (десен щрих): А – 24 час; Б – 48 час; В – 72 час.

2.3.7. Определяне на неураминидазна активност

Резултатите от изследването показват наличие в щам *A. caviae* A40/02 както на извънклетъчна (0.65 U/mg), така и на клетъчно-свързана неураминидазна активност, като последната е съсредоточена основно в цитозолната фракция (38 U/mg) и в по-малка степен в мембранната фракция (17.3 U/mg) (Табл. 6). За сравнение, при *H. parasuis* цялата клетъчно-свързана активност е концентрирана в мембранната фракция и липсва в цитозола (Lichtensteiger and Vimr, 2003).

Едновременното присъствие на извънклетъчна и вътреклетъчна неураминидазна активност в даден микроорганизъм може да се разглежда по два

начина. Наличието на вътреклетъчна неураминидаза може да бъде етап на „складиране“ на ензима преди да бъде експортиран извън клетката (Corfield, 1992). Ниската извънклетъчна активност се обяснява с акумулирането на ензима в цитозола и в периплазменото пространство.

В други случаи става въпрос за наличието на ензимни изоформи, които се различават както по своята локализация, така и по своите свойства (*P. aeruginosa*, *S. pneumoniae*) (Ghazaei et al., 2010; Kim et al., 2011).

2.3.8. Определяне на N-ацетилнеураминат лиазна (алдолазна) активност

Нашите изследвания доказват наличието на ензим с алдолазна активност, както в културални супернатанти (8.2 U/mg), така и в клетъчни екстракти (15 U/mg) от *A. caviae* A40/02 (Табл. 6). Във втория случай ензимът е установен в цитозолната фракция и не се открива в мембранната фракция. Независимо от своя произход (културална супернатанта или клетъчни екстракти) алдолазната активност е относително висока в сравнение с някои литературни данни и може да се регистрира след 1 час инкубация на реакционната смес при 37°C. За сравнение, при щамове *C. perfringens* забележима извънклетъчна алдолазна активност се отчита едва след 22 часа инкубация на реакционната смес при използване на същия тиобарбитуров метод (Fraser and Collee 1975).

Таблица 6. Неураминидазна и алдолазна активност на щам *A. caviae* 40/02

Ензим	Културална течност	Мембранна фракция	Цитозолна фракция
Неураминидаза, U/mg	0.65	17.3	38
Алдолаза, U/mg	8.2	-	15

При използването на тиобарбитуровия метод, наличието на алдолаза може да компрометира данните от неураминидазната реакция, тъй като разгражда продукта на тази реакция (сиаловата киселина) до колориметрично неактивните съединения пируват и N-ацетилманозамин. Предполага се, че високата алдолазна активност е една от причините за затруднено регистриране на неураминидазна продукция при някои микроорганизми (Fraser and Collee, 1975; Fraser and Brown, 1981). Напълно е възможно сравнително високата алдолазна активност при щам *A. caviae* A40/02 да „скрива” в по-малка или по-голяма степен реалната неураминидазна активност на този щам.

Интересен факт е, че алдолазна активност не се регистрира след 60% изсолване с амониев сулфат на културална супернатанта. Възможно е в процеса на изсолване да става освобождаване от този ензим. Някои автори обясняват високата неураминидазна активност след изсолване на културалната течност при наг-вибриони именно с частичното или пълно освобождаване от алдолазата (Вертиев и съавт., 1975).

Наличието на двата ензима (неураминидаза и алдолаза) в даден микроорганизъм се свързва не само със способността му да метаболизира сиаловите компоненти (Grobe et al., 1998), но има отношение и към неговата патогенност (Arden et al., 1972; Corfield T., 1992). Присъствието на неураминидаза и алдолаза в щам *A. caviae* A40/02 може да се обясни с

вероятната способност на този микроорганизъм да осъществява обмяна на сиаловите киселини. При секвениране на генома на щам *A. hydrophila* ML09-119 се оказва, че генът за неураминидаза се намира в съседство с гени, кодиращи N-ацетилнеураминат лиаза, N-ацетилманозамин киназа, N-ацетилглюкозамин-6-фосфат епимераза, както и транспортерни белтъци и транскрипционни регулатори. Това са гени, влизащи в състава на класическия *nan*-оперон - оперонът, координиращ процесите от сиалометаболизма в клетката. (Tekedar et al., 2013).

3. Характеризиране на неураминидазната продукция на щам *A. caviae* A40/02

3.1. Продукция на неураминидаза при различни условия на аерация и в различни хранителни среди

Щамът-продуцент демонстрира най-висока ензимна активност при статично аеробно култивиране – 0.70 U/mg и липса на такава при анаеробно култивиране. Ензимните активности при микроаерофилни условия и аеробно култивиране върху ротационна клатачка са сравнително еднакви - около 0.40 U/mg. Резултатите са представени в Табл.7.

Таблица 7. Извънклетъчна неураминидазна продукция и рН стойности при различни аерационни условия

Режим на аерация	OD (660nm)	Неураминидазна активност (U/mg)	стойност на рН	
			изходна	крайна
Анаеробен	0.48	-	8.0	5.5
Микроаерофилен	0.98	0.39	8.0	5.5
Статичен аеробен	1.7	0.70	8.0	9.5
Аеробен на клатачка	1.8	0.41	8.0	9.5

Значителна разлика се наблюдава в стойностите на рН на културалната течност между аеробни условия, от една страна, и анаеробни и микроаерофилни от друга.

От Табл. 7 става ясно, че статичният режим на култивиране е по-благоприятен за ензимната продукция в сравнение с култивирането на ротационна клатачка. В това отношение щам *A. caviae* A40/02 е подобен на микроорганизми като *C. canimorsus* и *V. cholerae* non-O1/13 и се различава от *C. diphtheriae* и *P. aeruginosa*, като при последните, култивирането на клатачка е по-подходящо за неураминидазната продукция (Mally et al., 2008; Kim et al., 2010; Ghazaei et al., 2010; Eneva et al., 2011).

Най-висока неураминидазна продукция се наблюдава при култивиране на щам *A. caviae* A40/02 в хранителните среди ВНІ и Хотингеров бульон (съответно 0.60 и 0.53 U/mg). Тези хранителни среди вероятно са са по-богати на свързани сиалови остатъци, което води и до повишена продукция на неураминидаза. Ензимната активност намалява в низходящ ред при използване на хранителните среди TSB и NB. Неураминидазна активност не се регистрира при култивиране в полусинтетична среда. Представените резултати са от 48-ия час на култивиране (Табл. 8)

Таблица 8. Продукция на неураминидаза в различни хранителни среди

Среда	Неураминидазна активност, U/mg белтък
ВНІ	0.60
Хотингеров бульон	0.53
TSB	0.50
Nutrient broth (NB)	0.30
Полусинтетична среда	-

3.2. Индукция на неураминидазния синтез

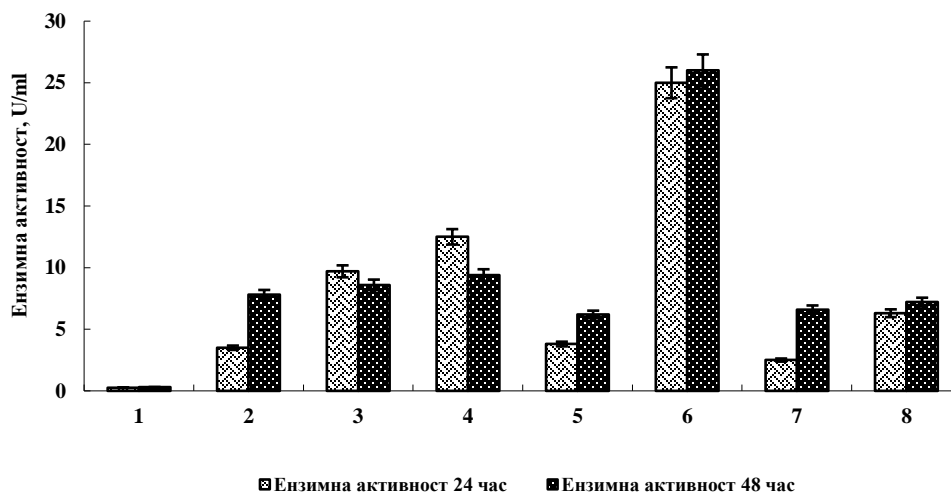
Експерименталните данни показват, че прибавянето на различни органични съединения в полусинтетична хранителна среда оказва стимулиращ ефект върху синтеза на неураминидаза от щам *A. caviae* A40/02 (Фиг. 10). Такива съединения или съдържат свързани сиалови остатъци, или самите те представляват структурни аналози на сиаловите киселини. В присъствие на някои от тях биосинтезата на ензима се засилва след 24-ия час. Така например, в присъствие на ГМП, казаминови киселини и трансферин ензимната активност на 48-часови култури е по-висока в сравнение с 24-ия час. Подобни резултати са получени и за *A. nicotianae*, при който в присъствие на ГМП се наблюдава по-висока ензимна продукция през 48-ия час в сравнение с 24-ия час (Абрашев, 2006). Стимулиращият ефект на високомолекулните съединения трансферин и фетуин намира потвърждение и в литературни източници в които подобни макромолекулни комплекси съдържащи свързани сиалови киселини са описани като индуктори на неураминидазния синтез (Corfield, 1992).

Сравнително добър стимулиращ ефект спрямо неураминидазната продукция на щам *A. caviae* A40/02 оказват сходните по структура със сиаловата киселина N-ацетилманозамин и N-ацетилглюкозамин. Стимулиращият ефект на N-ацетилманозамина е добре известен най-вече при представители на *P. multocida* (Drzeniek et al., 1972; Mizan et al., 2000), но също и при *Gardnerella vaginalis* и *S. pneumoniae* (von Nicolai et al., 1984; Gualdi et al., 2012).

Най-добър ефект спрямо неураминидазния синтез при щам *A. caviae* A40/02 оказва прибавянето на сиалова киселина в хранителната среда, което е в съзвучие и с редица литературни данни. Последните посочват положителното влияние на този компонент спрямо неураминидазния синтез при *A. sialophilus*, *C. perfringens*, *M. viridifaciens*, *S. oralis*, *T. forsythia*, *P. aruginosa*, *S. pneumoniae*

(Wang et al., 1978; Bouwstra et al., 1987; Aisaka et al., 1991; Byers et al., 2000; Thompson et al., 2009; Ghazaei et al., 2010; Gualdi et al. 2012).

Интересно е, че синтеза на неураминидаза от щам *A. caviae* A40/02 се стимулира както от съединения, съдържащи гликозидно свързани сиалови киселини (субстрати на ензимната реакция), така и от свободна сиалова киселина, която се явява продукт на реакцията. И това не е изненада, тъй като ензимната продукция по принцип се индуцира както от чувствителната на ензимно действие връзка (в случая α -гликозидната връзка), така и от една от двете съставки свързани в тази връзка (в случая сиаловата киселина).



Фигура 10. Резултати за ензимната активност в присъствие на вещества-индуктори в полусинтетична хранителна среда. 1- контрола; 2- ГМП; 3- N-ацетил манозамин; 4- N-ацетилглюкозамин; 5- казаминови киселини; 6- сиалова киселина; 7- трансферин; 8- фетуин.

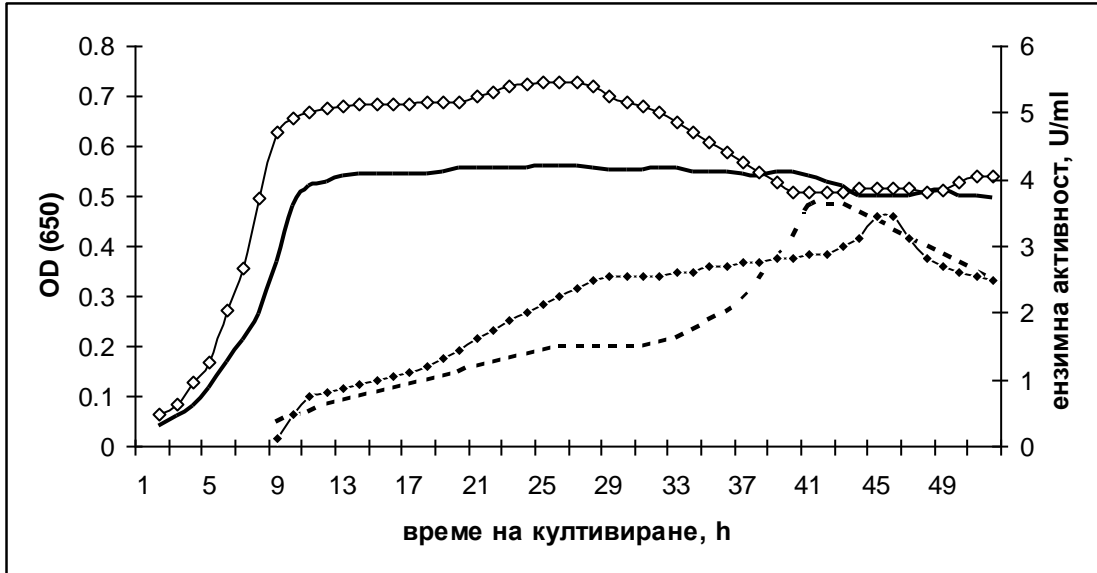
3.3. Динамика на ензимната продукция във връзка с растежните фази

Проследена е зависимостта между неураминидазната продукция и растежните криви при култивиране на щама в две различни хранителни среди (ВНІ и Хотингеров бульон). Изборът на хранителните среди е продиктуван от факта, че неураминидазната продукция е най-висока именно при култивиране на щама в тези две хранителни среди. Характерът на растежните криви в двете

хранителни среди е сходен, но при култивиране в ВНІ оптичната плътност достига по-високи нива (Фиг. 11). Експоненциалната фаза започва от около третия час и продължава до деветия час. В този период неураминидазната активност е едва забележима, като нейното нарастване започва с навлизане в стационарната фаза и е най-висока през късна стационарна фаза и фазата на отмиране. При култивиране върху ВНІ максимална ензимна активност се регистрира между 45-и и 49-и час (3.6 U/ml), докато в Хотингеровия бульон максимумът е изтеглен малко по-рано: между 41-и и 45-и час (3.9 U/ml).

Неураминизната продукция при повечето бактерии следва растежната крива и е максимална в късната експоненциална фаза. Обикновено навлизането в стационарна фаза се съпровожда с намаляване на ензимната активност, като в повечето случаи една от възможните причини е синтеза на протеаза. Подобен е характерът на неураминидазната синтеза при стрептококи от групите А и В, а също и при *S. oralis*, *P. aeruginosa* (Milligan et al., 1977; Davis et al., 1979; Straus and Portnoy-Duran, 1983; Byers et al., 2000; Ghazaei et al., 2010).

Нашите резултати по-скоро наподобяват данните, получени за *E. rhusiopathiae*, при който неураминидазната синтеза не следва растежната крива и максимално натрупване на ензим се отчита в средата на стационарна фаза (Wang et al., 2005). Сходни резултати са получени и за *P. multocida* (Drzeniek et al., 1972) и *V. cholerae* non O1/13 (Eneva et al., 2011). При първия микроорганизъм, максимална ензимна продукция се наблюдава между 50-и и 70-и час (късна стационарна фаза), което съвпада и с намаляването на оптичната плътност, а при втория най-високата неураминидазна активност се регистрира също през стационарна фаза (между 36-и и 40-и час). Едно от възможните обяснения за повишена ензимна активност в края на стационарната фаза при щам *A. caviae* A40/02, може да бъде започналият литичен процес, който води до освобождаване на вътреклетъчна неураминидаза.



Фиг. 11. Зависимост между растежните фази и неураминидазната продукция при щам *A. caviae* 40/02: -◇- крива на растежа в среда ВНІ, — крива на растежа в Хотингеров бульон, -◆- ензимна активност при растеж върху среда ВНІ, ензимна активност при растеж в Хотингеров бульон

4. Изолитране и пречистване на ензима неураминидаза

Разработеният метод за пречистване включва следните етапи: ултрафилтрация през мембрана 100 kDa, изсолване с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (60% насищане) и йонообменна хроматография с DEAE целулоза. Резултатите от баланса по пречистване са представени в Табл. 9.

За изолитране и пречистване на ензима се използва супернатанта от 48-часова статична култура, култивирана върху ВНІ бульон при 30°C. Специфичната активност на културалната течност е 0.65 U/mg. Супернатантата се подлага на ултрафилтрация през мембрана PM 100 kDa. При тази процедура се постига около 80 пъти концентриране на изходната културална течност, като освобождаването от баластен неспецифичен белтък е над 70%. Специфичната активност (97.5 U/mg) е 150 пъти по-висока в сравнение с изходната. Следващият етап включва изсолване с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (60% насищане), последвано от

диализиране и концентриране под налягане на диализирания материал през мембрана PM 100. На този етап става допълнително освобождаване от баластен белтък, като специфичната активност нараства на 146 U/mg.

Следващият етап на пречистване включва прилагане на йонообменна хроматография (DEAE целулоза). Използвани са следните буфери за елуиране: 0.05M фосфатен буфер, 0.2M фосфатен буфер и 0.2M фосфатен буфер съдържащ 0.6M NaCl. Всеки от първите два буфера елуира по един неактивен пик. Неураминидазната активност е съсредоточена в пика, който се елуира с 0.2 M буфер, съдържащ 0.6M NaCl (Фиг. 12). На този етап специфичната активност на ензимния препарат е 312 U/mg, което прави 480 пъти пречистване в сравнение с началния етап, като същевременно добивът намалява (24%) (Табл. 9).



Фиг. 12. Йонообменна хроматография на неураминидаза от щам *A. caviae* A40/02. Активният пик е отбелязан с червен пунктир.

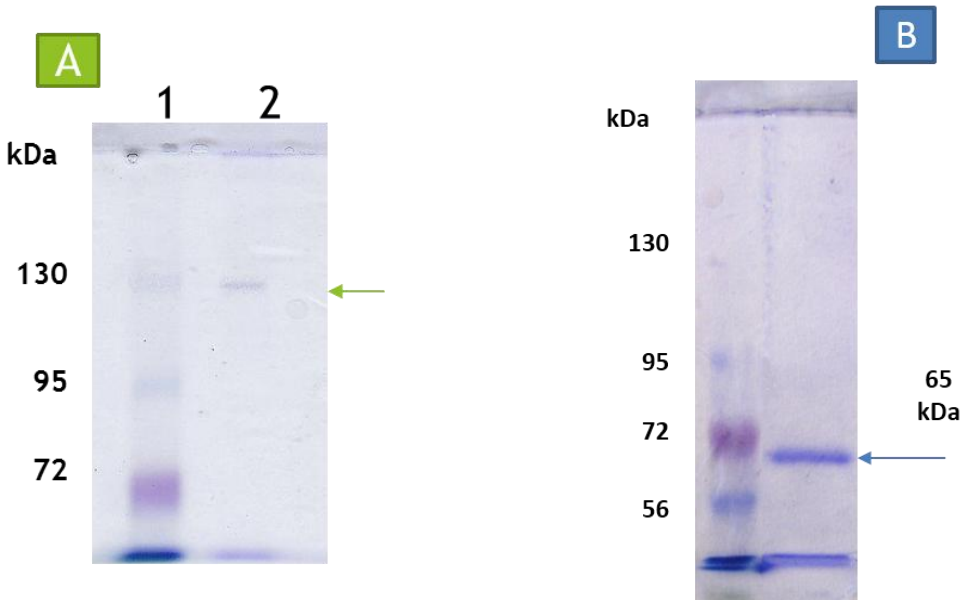
Таблица 9. Етапи на пречистване на неураминидаза от *A. caviae* 40/02

Етап на пречистване	Обем ml	Активно ст, U/ml	Тотална активно ст	Белтък mg/ml	Специфична активност, U/mg protein	Добив %	Степен на пречистване
Културална течност	400	7.8	3120	12	0.65	100	1
Ултрафилтрация през 100 kDa мембрана	5	312	1560	3.2	97.5	50	150
Утаяване с (NH ₄) ₂ SO ₄ -60% насищане	5	219	1095	1.5	146	35	224
Хроматография с DEAE целулоза	3	250	750	0.8	312	24	480

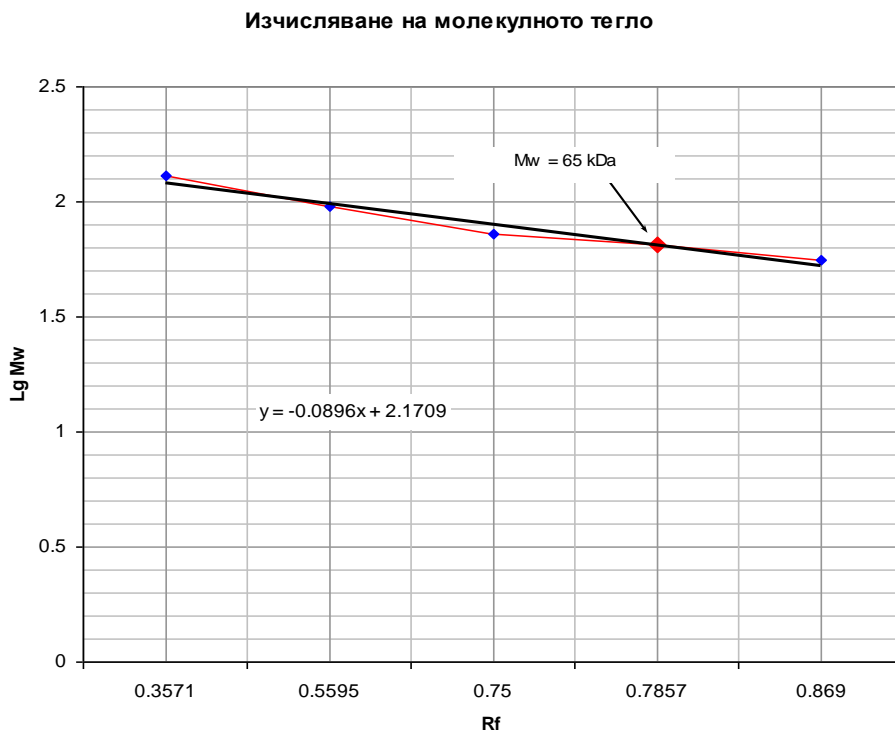
5. Характеризиране на пречистения ензим

5.1. Хомогенност на пречистения ензимен препарат в полиакриламидна електрофореза и молекулно тегло

Чистотата на препарата получен след ДЕАЕ целулоза е анализиран чрез нативна електрофореза и SDS-ПАГЕ (Фиг. 13). При анализ на ензимния препарат след ДЕАЕ целулоза в нативен гел се вижда, че неураминидазната ивица отговаря на молекулно тегло от около 130 kDa. При анализ на същия препарат в SDS-ПАГЕ неураминидазната ивица се наблюдава между 56 kDa и 72 kDa, като молекулното тегло на ензима определено чрез фактора на относителна подвижност е 65 kDa (Фиг. 14).



Фиг. 13. Оценка чистотата на ензимен препарат получен след ДЕАЕ целулоза в нативна електрофореза (А) и в SDS-ПАГЕ (Б). Линия 1: белтъчен маркер; линия 2: активна ензимна фракция след ДЕАЕ целулоза



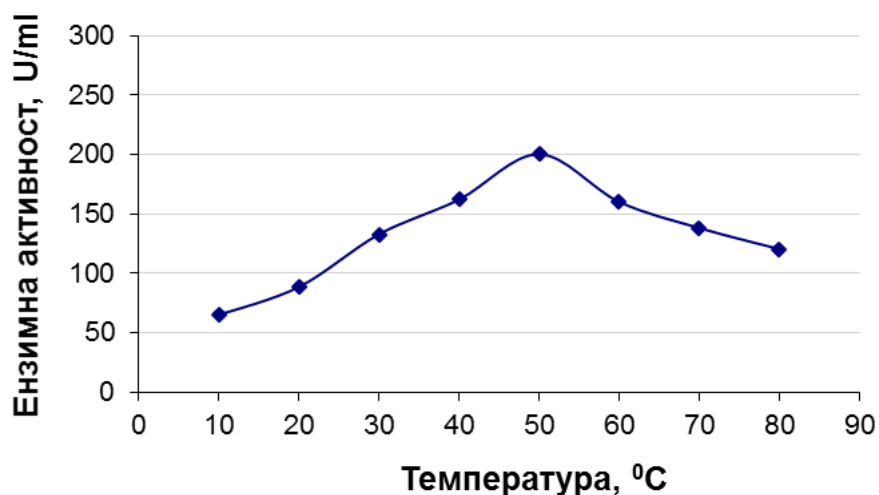
Фиг. 14. Изчисляване на молекулното тегло на неураминидаза от щам *A. caviae* A40/02 чрез фактора на относителна подвижност Rf.

Според литературните данни, неураминидазите се делят на „малки” (около 42 кDa) и „големи” (над 60 кDa) (Traving and Schauer 1998). Очевидно ензимът от щам А40/02 спада към „големите” неураминидази. При сравняване на молекулните тегла от SDS-ПАГЕ (65 кDa) и нативна електрофореза (130 кDa) може да се заключи, че ензимът е димер. Предполагаемата димерна структура на ензима от щам *A. caviae* А40/02 го нарежда в редицата на по-рядко срещаните олигомерни бактериални неураминидази (Schwerdtfeger and Melzig, 2010).

5.2. Влияние на физични, химични и биохимични фактори върху активността на ензима

5.2.1. Влияние на температурата върху активността на ензима

От графиката представена на Фиг. 15 се вижда плавното нарастване на ензимната активност с увеличаване на температурата над 10°C, като оптимумът е при 50°C. След тази температура активността видимо намалява.



Фиг. 15. Зависимост на ензимната активност от температурата

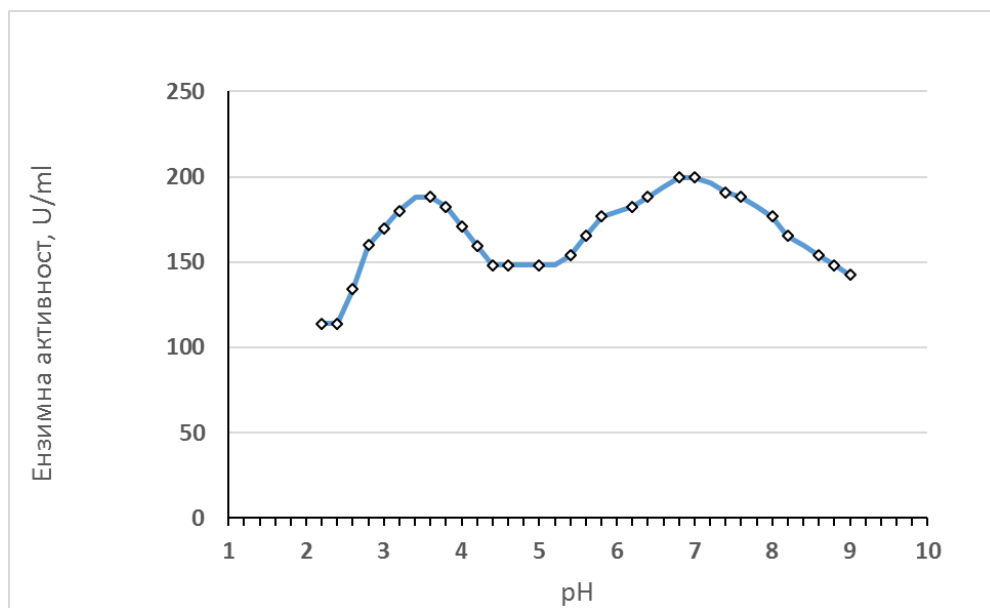
Установено е, че температурният оптимум на повечето неураминидази е в областта 35-40° C (Abrashv & Dulgerova, 2000). Все повече данни се натрупват за неураминидази от патогенни и непатогенни микроорганизми, демонстриращи максимална активност около 45-50°С и даже над 50°С. Като примери могат да бъдат посочени ензими от *M. viridifaciens* (58°С), *A. nicotianae* (45°С), *C. tertium* (50°С), *A. pyogenes* (55°С), *Bifidobacterium bifidum* (50°С), *V. cholerae* non-O1/13 (50°С) (Aisaka et al. 1991; Abrashv et al. 1998; Grobe et al. 1998; Jost et al. 2001, Kiyoura et al. 2011; Eneva et al. 2011). Очевидно, ензимът от щам *A. caviae* A40/02 принадлежи към тази група. И докато по-високият температурен оптимум на неураминидази от сапрофитен произход би могъл да отразява тяхната способност за усвояване на сиало-съдържащи съединения в природни биотопи, то по-необичайно е присъствието на неураминидази с по-висок температурен оптимум в патогени.

5.2.2. Влияние на рН върху активността на ензима

рН-стойностите в рамките, на които е изследвана ензимната активност се простират от 2.0 до 10.0 (Фиг. 16). Първоначален ясно изразен пик на ензимна активност се наблюдава в киселата област (около рН-3.5), след което има спадане и последващ разлят пик, обхващащ широка рН област от 5.0 до 9.0, с максимум при рН-7.0. При рН-10.0 неураминидазната активност рязко спада. Прави впечатление широкият рН-диапазон който обхваща вторият пик (Фиг. 16). Подобен характер има рН профилът и при някои други бактериални неураминидази. Например неураминидази от *C. perfringens* и *C. tertium* проявяват широк рН-оптимум в границите от 5.0 до 8.0 (за първия микроорганизъм) и от 4.5 до 8.0 (за втория микроорганизъм) (Corfield et al., 1985; Grobe et al., 1998). Сходни данни има и при щамове *E. rhusiopathiae*, чиито

неураминидази проявяват широк рН-оптимум в подобни граници-от 5.0 до 8.0 (Wang et al., 2005).

Интересна особеност е наличието на два оптимума при ензима от щам *A. caviae* A40/02. Аналогичен е рН-профилът на извънклетъчна неураминидаза от *P. aeruginosa* с първоначален пик на ензимна активност при рН-3.0 и вторичен (по-малък) при рН-7.0 (Ghazaei et al., 2010). Наличие на два рН-оптимума е установен и при *C. perfringens* (Fraser and Smith, 1975). Тези примери са по-скоро изключение, тъй като рН-оптимумът на повечето бактериални неураминидази е ясно изразен и лежи в леко киселата област, в интервала от 5.0 до 7.0. Присъствието на два оптимума се обяснява в някои случаи с използването на субстрати, съдържащи смес от α 2-3 и α 2-6 гликозидно свързани сиалови киселини, като ензимът има отделен рН-оптимум за хидролизата на всяка една от тези връзки (Fraser and Smith, 1975).



Фиг. 16. Влияние на различни стойности на рН върху ензимната активност на неураминидаза от щам *A. caviae* A40/02

Подобно може да бъде обяснението за двата оптимума при неураминидазата от щам *A. caviae* A40/02. В използвания субстрат (ГМП)

преобладават α 2-3 връзките, но в него присъстват, макар и в по-малка степен и α 2-6 свързани сиалови остатъци.

5.2.3. Влияние на различни химични съединения върху неураминидазната активност

Резултатите относно влиянието на металните йони върху активността на неураминидаза от щам *A. caviae* A40/02 са обобщени в Табл.10. Те показват сходства, но и различия с данни описани в литературата. Железните двувалентни и тривалентни йони, както и медните йони оказват известен подтискащ ефект (съответно 69, 81 и 88% от контролата). Инхибиращ ефект оказват тези елементи и при неураминидази от *C. chauvoei* NC08596, *S. pneumoniae*, *B. fragilis* (Heuermann et al., 1991; Parker et al., 2009; Yamamoto et al., 2018).

Инхибиращият ефект на медните йони спрямо неураминидазите понякога се обяснява с участието в каталитичния процес на сулфхидрилните групи от цистеиновите остатъци (Kim et al., 2010c; Kiyohara et al., 2011).

Нашите резултати посочват мангана като подчертан инхибитор. Подтискащ ефект оказва този елемент и спрямо неураминидази от *A. nicotianaе*, *C. jejuni* и *V. cholerae*, докато същият стимулира ензимното действие при *B. fragilis* и *C. chauvoei* (Berg et al. 1983; Heuermann et al. 1991; Abrashev et al., 1998; Cheng et al. 2008; Eneva et al., 2015).

Кобалтовите йони оказват лек стимулиращ ефект (увеличение с 12%) спрямо неураминидаза от щам *A. caviae* A40/02. В по-голяма или по-малка степен кобалтът оказва активизиращо действие и при стрептококи от група К, *C. ulcerans*, *C. tertium*, *C. perfringens* (Hayano. and Tanaka, 1967; Vertiev and Ezepchuk, 1981; Grobe et al., 1998; Li and McClane, 2014). Ясно изразен инхибиторен ефект има този елемент спрямо неураминидази от *E. rhusiopathiae* и *A. nicotianaе* (Абрашев, 2006).

Повечето литературни данни определят влиянието на цинковите йони спрямо неураминидазите като отрицателно. Примери в това отношение са ензимите от *C. ulcerans* (Vertiev and Ezerchuk, 1981), *B. fragilis* (Berg et al., 1983), *C. chauvoei* (Heuermann et al., 1991), *E. rhusiopathiae* (Абрашев, 2006), *V. cholerae* non O1/13 (Eneva et al., 2015). Незначителният стимулиращ ефект (увеличение с 5%) на този елемент върху неураминидазата от щам *A. caviae* A40/02 е по-рядко срещан и в известна степен е в съзвучие с данните за неураминидази при щамове стрептококи, *C. perfringens* или неураминидази от еукариотен произход (Hayano and Tanaka, 1967; Kishore et al., 1975; Li and McClane, 2014).

Таблица 10. Влияние на метални йони и EDTA върху неураминидазната активност на щам *A. caviae* A40/02

Солеви разтвор (10mM)	Активност, % от контролата	Солеви разтвор (10mM)	Активност, % от контролата
Контрола (dH ₂ O)	100	NaCl	110
CoCl ₂	112	FeSO ₄	69
CuCl ₂	88	HgI ₂	112
BaCl ₂	96	ZnSO ₄	105
Li ₂ SO ₄	105	CaCl ₂	103
MgCl ₂	103	KCl	106
FeCl ₃	81	MnSO ₄	28
CdCl ₂	106	Pb(CH ₃ COO)	91
NiSO ₄	104	EDTA	95

Стимулиращият ефект на живака спрямо ензима от щам *A. caviae* A40/02 е по-скоро изключение, тъй като в литературата този елемент е описан като силен ензимен инхибитор. Активиращо действие на живака е наблюдавано и по

отношение на неураминидаза от щамове на вируса на Нюкасълската болест (Oladele et al., 2008). По отношение на влиянието на калциеви йони и ЕДТА, бактериалните неураминидази се делят на два вида: такива, които се активират от Ca^{2+} и подтискат от ЕДТА, и такива, при които тези два компонента не оказват влияние. Нашите резултати посочват неураминидазата от щам *A. caviae* A40/02 като принадлежаща по-скоро към втората група.

Резултатите относно влиянието на различни химични съединения и инхибитори върху ензимната активност са обобщени в Табл. 11. От оксидиращите агенти, изцяло подтискащ ефект спрямо неураминидаза от щам *A. caviae* A40/02 оказва водородният пероксид в концентрация от 10 mM, докато N-бромсукцинимид не оказва влияние. В това отношение ензимът се различава от неураминидазните изоформи на *A. ureafaciens*, чиято активност се подтиска от N-бромсукцинимид, но не и от водороден пероксид (Uchida et al., 1979). N-бромсукцинимидът се явява инхибитор и на неураминидази от *M. viridifaciens* и *Trypanosoma evansi* (Aisaka et al. 1991; Nok et al. 2003). Това е триптофан-оксидиращ агент и липсата на негово влияние при щам *A. caviae* A40/02 подсказва вероятната неангажираност на тази аминокиселина в каталитичния процес.

В нашите изследвания карбонилните инхибитори тиосемикарбазид и хидразинхидрохлорид оказват силен инхибиращ ефект в концентрации от 10 mM. Тези резултати навеждат на предположението за прякото или косвено участие на карбонилните групи в каталитичния процес.

Инхибиращ ефект, макар и в по-слаба степен (75.61% от контролата) оказва и натриевият азид в концентрация от 10 mM.

Проучено е и влиянието на вещества като L-аскорбинова киселина, глутатион и цистеин, които разграждат дисулфидни мостове с образуване на сулфхидрилни групи (S-S дисоцииращи агенти). И трите съединения изцяло

подтискат неураминидазната активност на щам *A. caviae* A40/02 в концентрация от 10 mM. Повечето изследвания показват или липса, или незначително влияние на такива вещества по отношение на неураминидазното действие.

Таблица 11. Влияние на различни химични съединения върху ензимната активност

Химичен компонент	Крайна конц., mM	Активност, % от контролата	Крайна конц., mM	Активност, % от контролата
Контрола	-	100	-	100
ЕДТА	1	96.8	10	93.7
Натриев флуороацетет	1	95	10	97.56
Натриев арсенит	1	96	10	92.6
L-аскорбинова киселина	1	88.8	10	0
Глутатион	1	90.4	10	0
Цистеин	1	96	10	0
Тиосемикарбазид	1	97.6	10	0
Хидразин хидрохлорид	1	98.4	10	0
Натриев азид	1	100	10	75.61
N-бромсукцинимид	1	99.2	10	92.68
Водороден прекис	1	89.6	10	0

Примери в това отношение са неураминидази от *C. diphtheriae* (Warren and Spearing, 1963), щамове *Streptomyces* (Kunimoto et al., 1974), *A. ureafaciens* (Uchida et al., 1979), *M. viridifaciens* (Aisaka et al. 1991); *S. oralis* (Byers et al., 2000). Силното отрицателно влияние на S-S дисоцииращите вещества спрямо ензимната активност на щам *A. caviae* A40/02, по-скоро има аналог при някои неураминидази от вирусен и еукариотен произход (Edmond et al. 1966; Chen et al. 1994). Тези резултати позволяват да се спекулира относно присъствието на дисулфидни мостове и тяхната роля за каталитичния процес при неураминидаза от щам *A. caviae* A40/02.

5.3. Субстратна специфичност

Щам *A. caviae* A40/02 е активен спрямо всички изследвани субстрати, което подсказва способността на неураминидазата да хидролизира и трите типа гликозидни връзки в сиалосъдържащите съединения, а именно: α 2-3, α 2-6 и α 2-8 връзки (Табл. 12). Най-ефективно се разгражда ГМП. Следват в низходящ ред: човешки трансферин (74%), орозомукоид (72%), говежди трансферин (70%), фетуин (69%), конски серум (54%) и коломинова киселина (42%). По-ефективното действие спрямо глюкомакропептида вероятно отразява предпочитанията на ензима към α 2-3 връзки в сравнение с α 2-6 и α 2-8 такива, което е и характерно за повечето бактериални неураминидази (Traving and Schauer, 1998). В литературата са известни неураминидази, които са неефективни спрямо някои от посочените съединения. Така например неураминидазите от отделни щамове *P. aeruginosa* са неактивни спрямо природни сиалосъдържащи гликопротеини (вкл. орозомукоид) (Scharfman et al., 1991), докато ензимът от щам 122 на стрептококи от група В е неактивен спрямо фетуин, орозомукоид и коломинова киселина (Corfield, 1992). Някои неураминидази не хидролизират фетуин и други високомолекулни комплексни съединения какъвто е например ензимът NanH, изолиран от патогена *T. forsythia* (Thompson et al., 2009). Затруднената хидролиза на такива субстрати може да се дължи на различни причини. Известно е, че фетуинът съдържа N- и O-свързани сиалови остатъци. Възможно е някои ензими да изпитват затруднения при отцепването на сиалови остатъци прикрепени към O-свързани олигозахариди в гликопротеините (Hoyer et al., 1991). Липсата на активност в някои случаи може да се дължи и на високата степен на O-ацетилиране на сиаловите киселини в такива комплексни съединения, което от своя страна подтиска неураминидазното действие (Thompson et al., 2009). Ефективността на неураминидаза от щам *A. caviae* A40/02 спрямо фетуин и други

високомолекулни субстрати подсказва наличието на вероятен, но все още неизяснен механизъм, чрез който ензимът достига и атакува трудно достъпните мишени за хидролиза.

Правят впечатление почти еднаквите стойности на хидролиза спрямо човешки трансферин, орозомукоид и фетуин с лек превес към трансферина. Приблизително еднакви стойности за тези три субстрата проявява и неураминидазата от *C. diphteriae* с лек превес към орозомукоида (Kim et al., 2010c). По-често срещаните в литературата данни са за бактериални неураминидази, имащи диференциран афинитет към посочените сиалосъдържащи вещества. Отчетливо предпочитание към трансферина спрямо фетуина проявяват и двете изоформи на *A. ureafaciens* (Uchida et al., 1979), докато активността на неураминидаза от *P. multocida* към трансферина е определено по-слаба в сравнение с фетуин и орозомукоид (Mizan et al., 2000) .

По отношение на конския серум, в нашите експерименти той се хидролизира по-трудно в сравнение с фетуин, трансферин и орозомукоид, докато неураминидазата от *C. ulcerans* е по-ефективна спрямо този субстрат в сравнение с фетуин (Vertiev and Ezerchuk, 1981).

По-слабата активност на ензима от щам *A. caviae* A40/02 спрямо коломиновата киселина (42%) е в съзвучие с резултатите за повечето микробни неураминидази, които са слабо активни или направо неактивни към този субстрат. Като примери могат да се посочат неураминидазите от някои стрептококи (Milligan et al. 1977), *P. multocida* (White et al., 1995), *H. parasuis* (Lichtensteiger and Vimr, 1997), *T. forsythia* (Thompson et al., 2009), представители на *Bifidobacterium* (Kiyohara et al. 2011). Едно рядко изключение в това отношение е ензимът от *B. fragilis*, който предимно хидролизира α 2-8 връзките в коломиновата киселина (Yamamoto et al., 2018).

Способността на неураминидазата от щам *A. caviae* A40/02 да хидролизира субстрати с различни гликозидни връзки е особеност както на патогенни, така и на непатогенни микроорганизми - *Mycoplasma synoviae*, *Ornithobacterium rhinotracheale*, представители на *Bifidobacterium* (Bercic et al. 2011; Kastelic et al. 2013; Kiyohara et al. 2011).

Таблица 12 .Субстратна специфичност на неураминидаза от щам *A. caviae* 40/02

Вид субстрат	Тип гликозидна връзка	Ензимна активност, U/ml	Ензимна активност, % от контролата
ГМП (контрола)	$\alpha 2-3$	200	100
конски серум	$\alpha 2-3, \alpha 2-6$	108.5	54
говежди	$\alpha 2-3, \alpha 2-6$	140.9	70
трансферин човешки	$\alpha 2-6 > \alpha 2-3$	148.5	74
трансферин фетуин	$\alpha 2-6 > \alpha 2-3$	138.5	69
орозомукоид	$\alpha 2-6 > \alpha 2-3$	144.2	72
коломинова киселина	$\alpha 2-8$	88.3	42

Относително широката субстратна специфичност на неураминидазата от щам *A. caviae* A40/02 вероятно спомага за по-доброто преживяване и оцеляване на микроорганизма в околната среда или има отношение към възможната му патогенност. Много често в литературата способността на бактериалните неураминидази да разграждат високомолекулни субстрати се свързва с патогенността на съответните продуценти (von Nicolai et al., 1984; Abrashev and Orozova, 2006).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение може отново да се подчертае, че данни относно продукцията и биохимичните характеристики на неураминидаза при този род бактерии в литературата липсват. В този смисъл щам *A. caviae* A40/02 се нарежда в дългата редица на микроорганизми продуциращи неураминидаза, чиято прецизна роля и биологично значение в конкретния щам предстои да се изясняват. При щама продуцент е установен и ензима N-ацетилнеураминат лиаза (алдолаза), който както се видя от литературния обзор, много често е част от същия метаболитен път, в който участва и неураминидазата. Този факт е показателен, тъй като бактериите, в които двата ензима присъстват, са в състояние да метаболизират сиаловите киселини за различни свои нужди. Установени са оптималните условия за продуциране на извънклетъчна неураминидаза (режим на аерация, хранителна среда), както и веществата, които индуцират неураминидазния биосинтез. Разработената относително проста схема на пречистване позволява получаването на ензима в електрофоретично чист вид, а неговите свойства като температурна зависимост и рН-оптимум показват както сходства, така и различия с изследванията относно същия ензим при други микроорганизми. За отбелязване е необичайния рН-профил на ензима, както и някои особености отнасящи се до влиянието на различни химични компоненти върху ензимната активност. В тази връзка сме се постарали да дадем една по-пълна палитра от литературни данни (включително и някои по-стари цитати), тъй като, както се спомена, данни относно *Aeromonas* в това отношение липсват.

И накрая - надяваме се, сегашната работа да е успешен опит за попълване на една празнина в знанията ни относно биосинтеза и биохимичните особености на ензима неураминидаза при представител на род *Aeromonas*.

ИЗВОДИ

1. Ензимът неураминидаза участва в ензимния апарат на бактерии от род *Aeromonas*. Изолираният от речна вода щам *Aeromonas caviae* A40/02 е първия установен продуцент на ензима от този вид. Той продуцира както извънклетъчна неураминидаза, така и вътреклетъчна неураминидаза, част от която е мембранно-свързана.
2. Щам *Aeromonas caviae* A40/02 продуцира и извънклетъчна и клетъчно-свързана N-ацетилнеураминат лиаза (алдолаза), ензим от метаболитния път на сиаловите киселини, като щамът е първият регистриран представител на род *Aeromonas*, синтезиращ този ензим.
3. Най-висока секреция на ензима се наблюдава в края на стационарната фаза на растеж (48-и час), при микроаериране и култивиране в богатата органична среда.
4. Синтеза на ензима се индуцира от различни високо- и нискомолекулни вещества, като най-ефективен индуктор се оказва сиаловата киселина.
5. Разработената схема на пречистване на ензима включваща ултрафилтрация през мембрана 100 кДа, 60% изсолване с амониев сулфат и йонообменна хроматография с ДЕАЕ целулоза позволява получаването на пречистен ензимен препарат със специфична активност 312 U/mg и степен на пречистване 480 пъти.
6. Данните за молекулното тегло, които са първи за неураминидаза от род *Aeromonas*, показват, че ензимът има димерна структура.
7. При изследване влиянието на рН се наблюдават две области на по-висока ензимна активност: при рН – 3.5 и рН – 7.0. По отношение на температурния оптимум, максимална ензимна активност се регистрира при 50°C.

8. Ензимната активност се инхибира от медни, железни и манганови йони, както и от S-S дисоцииращи агенти и карбонилни инхибитори. Действието на неураминидазата се стимулира в различна степен от кобалтови, натриеви и живачни йони в концентрация от 10 mM. Ензимната активност не се повлиява от калциеви йони и ЕДТА.
9. Ензимът отделя сиалови киселини от различни субстрати съдържащи и трите типа гликозидни връзки (α 2-3, α 2-6 и α 2-8), като най-ефективен е спрямо глюкомакропептид, съдържащ преимуществено α 2-3 връзки.

ПРИНОСИ

1. За пръв път е доказана синтезата на ензима неураминидаза от вид *Aeromonas caviae*.
2. Подбран е щам *A. caviae* A40/02, ефективен продуцент на извънклетъчна и клетъчно-свързана неураминидаза.
3. За първи път са получени данни за физикохимичната характеристика на ензима неураминидаза, продуциран от бактерии от род *Aeromonas*.
4. За първи път в представител на род *Aeromonas* е установено наличието на ензима N-ацетилнеураминат лиаза (алдолаза) – ензим от метаболитния път на сиаловите киселини.
5. Разработена е схема за култивиране на продуцента с цел получаване на максимален добив от ензима
6. Разработена е ефективна схема за получаване на електрофоретично чист ензимен препарат неураминидаза.

ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА:

- 1. Engibarov, S, Eneva, R, Abrashev, I.** (2015) Neuraminidase (sialidase) from *Aeromonas* sp. strain 40/02 – isolation and partial purification. *Annals of Microbiology*, 65, 3, Springer, ISSN:1590-4261, DOI 10.1007/s13213-014-0990-0, 1515-1523. **ISI IF:1.232**
- 2. Engibarov, S., Eneva, R, Abrashev, R., Kolyovska, V..** Characterization of neuraminidase from *Aeromonas* spp. strain A40/02: influence of chemical compounds and substrate specificity. *Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences*, 70, 4, Издателство на БАН "Проф. Марин Дринов", 2017, 505-510. **ISI IF:0.27**
- 3. Абрашев, И, Енгибаров, С, Енева, Р.** Род *Aeromonas* – биология и екология. *Екологично инженерство и опазване на околната среда*, 2, 2009, ISSN:1311-8668, 42-49
- 4. Engibarov, S, Eneva, R, Abrashev, R, Abrashev, I.** Neuraminidase from Environmental and Clinical Isolates of *Aeromonas* spp. – Biochemical Studies on the Enzyme Production. *Problems of Infectious and Parasitic Diseases*, 38, 1, Издателство Медицина и физкултура, 2010, ISSN:0204-9155, 37-39

ДОКЛАДИ

1. **Engibarov S., Eneva R., Kolyovska V., Abrashev I.** Induction of neuraminidase production in *Aeromonas* strain A 40/02. Oral presentation. 13th Congress of Microbiologists in Bulgaria. 7-10.10. 2014, Tryavna, Bulgaria
2. **Енгибаров С., Енева Р., Кольовска В., Абрашев И.** Неураминидаза от щам *Aeromonas* sp. 40/02: индукция, частично пречиствани и субстратна специфичност, Докторантски симпозиум “Молекулярната биология-отблизо. Предизвикателства и перспективи.”, 1.12 – 2. 12. 2014 г., Институт по молекулярна биология-БАН, София
3. **Engibarov S., Eneva R., Kolyovska V., Abrashev I.** Some biochemical properties of neuraminidase from *Aeromonas* strain A40/02, VIth Workshop on Experimental models and methods in biomedical research”, 12.05 – 14.05. 2015, IEMPAM-BAS, Sofia, Bulgaria
4. **Engibarov S., Eneva R., Petrova P., Kolyovska V., Abrashev R.** Characterization of a sialidase from *Aeromonas caviae* 40/02. Oral presentation. 14th Congress of Microbiologists in Bulgaria. 10-13.10. 2018, Hisarya, Bulgaria

ПОСТЕР:

Engibarov S., Eneva R., Abrashev I. Growth media and neuraminidase purification from *Aeromonas* sp. strain 40/02. Poster presentation. VIII Balkan congress of Microbiology Microbiologia Balkanica 2013, Veliko Tarnovo, Bulgaria

БЛАГОДАРНОСТИ

Издавам моята дълбока благодарност към моя покоен научен ръководител проф. Игнат Абрашев за топлото отношение, безрезервна подкрепа и най-вече за пълното му доверие към мен, дори в мигове на трудности.

Дължа голяма благодарност и на колегите, които ми оказваха безценна помощ, по един или друг начин, през целия период на дисертационния труд, а именно: гл. асистент д-р Румяна Енева, доц. д-р Радослав Абрашев, доц. д-р Пенка Петрова, проф. Мария Ангелова, доц. д-р Златка Алексиева, доц. д-р Петър Петров от НЦЗПБ, чл. кор. проф. д-р Христо Найденски, доц. д-р Маргарита Камбурова, дбн, доц. д-р Таня Стратева от Медицинския университет и всички други колеги, от които съм срещал съдействие и подкрепа.