

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES

COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

L'UNIVERSITE NATIONALE I.I. METCHNIKOV D'ODESSA

- ECOLE DOCTORALE N° 600
Ecole doctorale Ecologie, Géosciences, Agronomie et Alimentation
Spécialité : Microbiologie, virologie et parasitologie

Par

Andrii MERLICH

Caractérisation de la souche *Enterococcus italicus* ONU547 productrice de bactériocine

Thèse présentée et soutenue à « Université nationale I.I. Metchnikov d'Odessa », le « 30.11.18 »

Unité de recherche : INRA UR1268, BIA ; laboratoires de Département de Microbiologie, Virologie et Biotechnologie d'ONU ; laboratoires de Centre biotechnologique de Recherche et de Formation d'ONU

Rapporteurs avant soutenance :

Dr. Larysa SKIVKA, professeur, Université Nationale Taras-Chevtchenko de Kiev

Dr. Mykola PATYKA, professeur, Université Nationale des Ressources Biologiques et de la Conservation de la Nature de l'Ukraine, Kiev

Composition du Jury :

Président : Prof Dr. Vehary SAKANYAN, Université de Nantes

Examineurs : Prof Dr. Vehary SAKANYAN, Université de Nantes

Dr. Mykola GALKIN, Université nationale I.I. Metchnikov d'Odessa

Dr. Nataliia LIMANSKA, Université nationale I.I. Metchnikov d'Odessa

Dr. Larysa SKIVKA, professeur, Université nationale Taras-Chevtchenko de Kiev

Dr. Mykola PATYKA, professeur, Université nationale des ressources biologiques et de la conservation de la nature de l'Ukraine, Kiev

Dir. de thèse : Prof Dr. Thomas HAERTLÉ, BIA, R1268, INRA, NANTES

Co-dir. de thèse : Prof Dr. Volodymyr IVANYTSIA, Université Nationale I.I. Metchnikov d'Odessa

UNIVERSITY OF NANTES
FACULTY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
ODESSA I.I. MECHNIKOV NATIONAL UNIVERSITY

ÉCOLE DOCTORALE : VENAM

Year 2018
library

N^o assigned by the

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Characterization of *Enterococcus italicus* ONU547 strain bacteriocin producer

PhD THESIS

Discipline: Microbiology

Specialty: Microbiology

Presented by

Andrii MERLICH

On 30 November, 2018

Approved by jury:

President: Prof Dr. Vehary SAKANYAN, University of Nantes

Reporters: Prof Dr. Larysa SKIVKA, Taras Shevchenko National University of Kyiv
Prof Dr. Mykola PATYKA, National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine

Examinators: Prof Dr. Vehary SAKANYAN, University of Nantes
Dr. Mykola GALKIN, Odessa I.I. Mechnikov National University
Dr. Nataliia LIMANSKA, Odessa I.I. Mechnikov National University

Supervisors: Prof Dr. Thomas HAERTLÉ, BIA-FIP, INRA, NANTES
Prof Dr. Volodymyr IVANYTSIA, Odessa I.I. Mechnikov National University

НАНТСЬКИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ФАКУЛЬТЕТ НАУКИ ТА ТЕХНІКИ
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.І. МЕЧНИКОВА

ДОКТОРСЬКА ШКОЛА: VENAM

Рік 2018
бібліотека

№ присвоєний

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Характеристика штаму *Enterococcus italicus* ОНУ547 продуцента бактеріоцину

PhD ДИСЕРТАЦІЯ

Дисципліна: Мікробіологія

Спеціальність: Мікробіологія

Представлена

Андрієм МЕРЛІЧЕМ

30 листопада, 2018

Затверджено журі:

Президент: Проф. др. Вегарі САКАНЯН, Нантський університет

Доповідачі: Проф. др. Лариса СКІВКА, Київський національний університет імені Тараса Шевченка

Проф. др. Микола ПАТИКА, Національний університет біоресурсів і природокористування
України

Екзамінатори: Проф. др. Вехарі САКАНЯН, Нантський університет

Др. Микола ГАЛКІН, Одеський національний університет імені І.І. Мечникова

Др. Наталія ЛІМАНСЬКА, Одеський національний університет імені І.І. Мечникова

Керівники: Проф. др. Томас ХАЕРТЛЕ, VIA-FIP, INRA, Нант

Проф. др. Володимир ІВАНИЦЯ, Одеський національний університет імені І.І. Мечникова

RÉSUMÉ

Malgré la large spectrum de métabolites des bactéries lactiques (BL), les bactériocines, peptides à l'activité antimicrobienne, sont étudiées intensément donc elles sont considérées comme un supplément possible aux antibiotiques et sont utilisées comme conservateurs en l'industrie alimentaire (Visser and Holzapfel 1992; Atrih et al. 2001; Audisio et al. 2005; Gupta et al. 2010; Aguilar and Klotz 2010; Klewicka and Libudzisz 2004; Shrestha et al. 2014; Rodridues et al. 2004; Perez et al. 2014). Sauf valeur appliquée importante, l'étude de représentants du groupe BL et de leurs produits métaboliques à l'activité antagoniste est importante aussi du point de vue de recherches fondamentales parce que bactéries de pas tous espèces de BL ont étudiées pour la composition et les caractéristiques de leurs métabolites antimicrobiens. La même chose s'applique aussi au les représentants de l'espèce *Enterococcus italicus* (Gaaloul et al 2014).

L'objet de recherche était l'étude de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques isolées de produits fermentés d'origine végétale et animale collectés sur les marchés d'Ukraine, de France, de Thaïlande, recherche parmi elles une productrice de bactériocine et l'étude de ses caractéristiques. **Les objectifs de recherche** inclus:

- 1) Étudier des isolats de bactéries lactiques de produits fermentés d'origine végétale et animale d'Ukraine, de France et de Thaïlande.
- 2) Étudier la diversité génétique des isolats de *L. plantarum* par résultats d'analyse des profils de RAPD-PCR.
- 3) Effectuer le dépistage des souches de bactéries lactiques et choisir une productrice de bactériocine.
- 4) Étudier les caractéristiques tinctoriales, morphologiques, culturelles, physiologiques, biochimiques et moléculaires et identifier la productrice de la bactériocine.
- 5) Élaborer méthodes d'extraction et de purification de la bactériocine et déterminer ses propriétés.
- 6) Étudier l'effet de la bactériocine sur formation des biofilms par microorganismes indicateurs.
- 7) Établir la capacité des bactéries produisant la bactériocine à former des biofilms sur les surfaces des plantules de plantes de cresson alénois.
- 8) Étudier l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques de la souche productrice de la bactériocine contre les microorganismes pathogènes en expériences *in vivo*.

Structure et volume du mémoire. Le mémoire est composé de introduction, de revue de littérature, de partié expérimentale contenant 4 sections, de généralisation, de conclusions et de liste de littérature citée incluant 242 sources. Le contenu principal du mémoire est exposé sur 143 pages du texte dactylographié. Le matériel illustratif est exposé sous la forme de 28 figures et de 13 tableaux.

Matériels et méthodes. La partie expérimentale du mémoire a été réalisée au laboratoire «Biopolymères-Interactions-Assemblages» de Institut national de la recherche agronomique (INRA) de Nantes, France et au Département de Microbiologie, Virologie et Biotechnologie d'Université nationale I.I. Metchnikov d'Odessa.

Pour la recherche de productrices de bactériocines nous avons étudié isolats de BL d'échantillons de produits fermentés d'origine végétale et animale collectés sur les marchés d'Ukraine, de Thaïlande, de France. Les souches de bactéries-indicatrices *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM 1157, *Escherichia coli* CIP 76.24, *Brochothrix thermosphacta* DSMZ 20171, *Pediococcus pentosaceus* DMST 18752, *Listeria innocua* CIP 80.11 (ONIRIS), *Listeria ivanovii* subsp. *ivanovii* 20750, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Rhizobium radiobacter* C58, *Erwinia carotowora* ZM1, *Ralstonia solanacearum* UCM B-1109, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 8511, *P. syringae* pv. *atrofaciens* 13, *Rhizobium vitis* UA6 et *Rhizobium rhizogenes* 15834 ont été utilisées dans le travail aussi.

La microscopie a été réalisée par le microscope électronique JEOL JEM 1400 (Akishima, Tokyo, Japon). Composition des acides aminés, des sucres et des acides organiques a été déterminée par chromatographie et spectrométrie de masse sur l'appareil Agilent 6890N/5973inert (Agilent Technologies, Santa Clara, États-Unis), des acides gras – par utilisation d'un système automatique d'identification des microorganismes MIDI Sherlock sur la base d'un chromatographe en phase gazeuse avec détecteur à ionisation de flamme Agilent 7890 (Agilent Technologies, États-Unis) (Jámbor and Molnár-Perl 2009; Guerrant and Moss, 1984; Rainey and Oren 2011; http://www.midi-inc.com/pdf/Sherlock_MIS_Operating_Manual.pdf).

Détermination de sensibilité aux antibiotiques des bactéries a été réalisée en utilisant de la trousse ATB™ ENTEROC 5 (Biomérieux, France). Séquençage du gène de l'ARNr 16S a été réalisé par la méthode de Sanger dans GATC Biotech (Allemagne), cladogramme a été construit avec le programme MEGA6 par la méthode du Neighbor-Joining en utilisant la méthode à deux paramètres de Kimura (Tamura et al. 2013; Kimura 1980; Saitou and Nei 1987; Felsenstein 1985). Chromatographie échanges d'ions, chromatographie hydrophobe, chromatographie liquide à haute performance en phase inverse (CLHP), chromatographie échanges d'ions avec le système AKTA Explorer ont été utilisées pour la purification de la bactériocine (Hwanhlem et al. 2013; H-Kittikun et al. 2015).

La mass moléculaire de la bactériocine a été déterminée par électrophorèse des protéines sur gel de polyacrylamide avec tricine et dodécylsulfate de sodium (Tricine-SDS-PAGE) (Schägger and von Jagow 1987; Sahingil et al. 2011; H-Kittikun et al. 2015).

Étude de diversité génétique des isolats a été réalisée par RAPD-PCR avec primer M13 (Ben Omar et al. 2008).

Détermination de l'activité antagoniste des bactéries lactiques contre phytopathogènes *in vivo* a été réalisée sur explants de carotte (*Daucus carota* L.) (Ryder et al. 1985). Capacité à former des biofilms sur surfaces végétales a été étudiée sur le modèle de cresson alénois (*Lepidium sativum* L.) (Galkin et al. 2012). Les expériences ont été effectuées en trois reprises au moins. Le traitement statistique (moyenne, écart type, erreur type de la moyenne) et construction des graphes ont été réalisées en utilisant du programme Microsoft Office Excel.

Résultats

Le mémoire est consacré à l'étude de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques (BL) isolées de produits fermentés collectés sur les marchés d'Ukraine, de France et de Thaïlande, à recherche parmi elles une productrice de bactériocine et à l'étude ses caractéristiques.

108 isolats des lactobactéries de produits fermentés d'origine végétale et animale d'Ukraine, de France et de Thaïlande ont été étudiés pour la recherche de productrice de bactériocine. Les représentants de l'espèce *L. plantarum* ont été révélés en pourcentage 58.3 % dans le moût des baies de raisin d'Ukraine et 38.2 % - de France. L'étude de la diversité des souches de *L. plantarum* du moût des raisins récoltés dans plantations d'Ukraine selon les résultats d'analyse des profils de RAPD-PCR a montré l'absence de relations entre l'origine des isolats et leurs profils génétiques dans le cas de la majorité des clusters de dendrogramme construit.

Pendant le dépistage d'activité bactériocinogène une souche bactérienne capable de produire une bactériocine a été isolée du chou fermenté de Thaïlande et ses propriétés morphologiques, culturelles, physiologiques, biochimiques et le séquençage du gène de l'ARNr 16S ont permis de l'identifier comme *Enterococcus italicus*. C'est le premier rapport sur l'isolation de souche d'*E. italicus*, capable de produire une bactériocine, du matériel végétal.

Détermination de la composition en acides aminés des cellules des bactéries de la souche *E. italicus* ONU547 a montré que L-arginine, glycine et L-acide glutamique dominant dans le pool d'acides aminés et L-lysine est absente.

Parmi les sucres identifiés, glucose est présente dans la plus grande quantité quel constituant 87.7% de la quantité totale. Galactose (5.2%), arabinose (3.3%), mannose (1.2%), xylose (1.2%) et rhamnose (1.1%) sont présents en plus petites quantités. Il a été déterminé que les bactéries de la souche *E. italicus* ONU547 sont capables de produire seulement l'acide acétique parmi les acides organiques.

Parmi les acides gras saturés, les acides dodécanoïque ($C_{12:0}$), tétradécanoïque ($C_{14:0}$), hexadécanoïque ($C_{16:0}$), heptadécanoïque ($C_{17:0}$), octadécanoïque ($C_{18:0}$) et cyclopropanoïque ($C_{19:0}$ cyclo w8c) ont été trouvé, alors que parmi les acides gras insaturés – les mélanges d'acides hexadécénoïque ($C_{16:1}w7c/C_{16:1}w6c$) et d'acides octadécénoïque ($C_{18:1}w7c/C_{18:1}w6c$) et l'acide eicosénoïque ($C_{20:1}w7c$). En général, les acides gras saturés des bactéries de la souche *E. italicus* ONU547 constituent 31.7 % et insaturés – 68.3 %.

Il a été observé que les bactéries de la souche *E. italicus* ONU547 sont sensibles au chloramphénicol, la rifampicine, la lévofloxacine, la vancomycine, la teicoplanine, la nitrofurantoïne et la streptomycine HC. Elles sont modérément sensibles à la ciprofloxacine et sont résistantes à la pénicilline, l'ampicilline, l'érythromycine, la tétracycline et la gentamicine.

Sauf les bactéries de la souche indicatrice *L. sakei* subsp. *sakei* JCM1157, qui cause des dommages du jambon, de viande fumée, la souche isolée *E. italicus* ONU547 montre l'activité inhibitrice aussi contre l'agent de détérioration de produits alimentaires *Brochothrix thermosphacta* DSMZ 20171 et contre le pathogène des animaux et pathogène

conditionnel de l'homme *Listeria ivanovii* subsp. *ivanovii* 20750.

Les méthodes différents d'isolement et de la purification comme la précipitation de sulfate d'ammonium, la chromatographie hydrophobe, la chromatographie échanges d'ions et la chromatographie liquide à haute performance en phase inverse (CLHP) ont été essayés par utilisation des matrices, appareils et solvants différents pour la purification et l'étude des propriétés de la bactériocine. La plus haute activité de la bactériocine (5120 UA) a été obtenu par utilisation de combinaison de la chromatographie hydrophobe et la chromatographie échanges d'ions. La bactériocine étudiée a révélé sa nature cationique et sa hydrophobicité.

La bactériocine purifiée par la chromatographie se sépare en deux bandes pendant électrophorèse sur PAGE lesquelles ont montré l'activité inhibitrice contre *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157. Une masse moléculaire de l'entérotoxicine d'*E. italicus* ONU547, déterminé par Tricine-SDS-PAGE, a été de 2 et 3 kDa. La littérature rapporte une synthèse par les bactéries de l'espèce *E. italicus* d'entérotoxicine A et d'entérotoxicine B avec la masse moléculaire d'environ 5 kDa (Gaaloul et al. 2014; Aymerich et al. 1996; Casaus et al. 1997). La bactériocine de la souche *E. faecalis* NKR-4-1 (entérotoxicine W) de deux composants avec la masse 3256.5 et 2728.6 Da ressemble par de sa masse moléculaire la bactériocine d'*E. italicus* ONU547 (Sawa et al. 2012).

Il a été montré pour la première fois, que le chauffage à 80 °C pendant 30 min et à 100 °C pendant 15 min augmentent l'activité de la bactériocine du surnageant quatre fois (jusqu'à 1280 UA/ml) et dans le cas d'autoclavage à une atmosphère pendant 15 min – deux fois (640 UA/ml). Donc, l'augmentation de l'activité antimicrobienne de la bactériocine non traitée peut être causé par une amélioration de sa solubilité en résultat de réduction d'une hydrophobicité sous l'influence du chauffage. Contrairement à la bactériocine non traitée, le chauffage n'affecte pas d'activité de la bactériocine purifiée.

Il a été montré pour la première fois que l'entérotoxicine purifiée inhibe une formation de biofilms par *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 et par *P. aeruginosa* PAO1 de 52.5 % et 48.0 %, respectivement.

La bactériocine du surnageant inhibe la formation de biofilm de *P. aeruginosa* PAO1 de 41.4 %.

Il a été montré que les bactéries des souches *E. italicus* ONU547, *L. plantarum* ONU12 et ONU311 sont capables à former des biofilms sur les surfaces des plantules de cresson alénois. Donc, nous avons montré pour la première fois la capacité de BL *E. italicus* à former des biofilms sur les surfaces végétales. La capacité à former des biofilms par les consortiums les bactéries d'*E. italicus* et de *L. plantarum* sur les surfaces de cresson alénois a été montré.

Il a été montré que les bactéries de la souche *E. italicus* ONU547 inhibent la croissance les bactéries phytopathogènes *R. radiobacter* C58 et *E. carotovora* ZM1 *in vivo* sur des explants de carottes de 33.3 et 24.8 %. Probablement, l'activité antagoniste *in vivo* est due à des forte propriétés d'adhésion et/ou à la compétition pour des nutriments. Ceci est le premier rapport sur l'activité inhibitrice des bactéries de l'espèce *E. italicus* contre phytopathogènes.

Alors, à l'appuis des résultats obtenus on peut faire la conclusion que la bactériocine d'*E. italicus* ONU547 grâce à ses propriétés antimicrobiennes et à la

résistance à hautes températures peut être prometteuse comme un conservateur alimentaire. La souche *E. italicus* ONU547 et les souches *L. plantarum* capables de former ensemble les biofilms sur les surfaces de plantes manifestent l'activité antimicrobienne contre les microorganismes phytopathogènes peuvent être recommandées pour le développer des préparations biologiques de protection des plantes.

Conclusions

En thèse les isolats de bactéries lactiques isolés de produits fermentés collectés sur les marchés d'Ukraine, de France et de Thaïlande ont été étudiés, les bactéries de la souche productrice de la bacteriocine *E. italicus* ONU547 ont été isolées et ses caractéristiques morphologiques, culturelles, physiologiques, biochimiques, moléculaires et la composition biochimique ont été étudiées, sa bacteriocine a été purifiée et étudiée.

1. Il a été montré que parmi des isolats de lactobacilles obtenus de moûts de raisins d'Ukraine et de France les représentants de *L. plantarum* ont été trouvés en 58.3 % et 38.2 %, respectivement. L'étude de la diversité de souches de *L. plantarum* isolées de moûts de baies de raisins collectés sur plantations d'Ukraine par les résultats d'analyse des profils de RAPD-PCR a montré l'absence d'une relation entre origine des isolats et leurs profils génétiques.
2. La souche productrice de bacteriocine d'*E. italicus* a été révélée pour la première fois parmi microbiote de plantes fermentées. Il a été établi que la bacteriocine de la souche *E. italicus* ONU547 inhibe la croissance de bactéries *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157, *Brochothrix thermosphacta* DSMZ 20171 et *Listeria ivanovii* subsp. *ivanovii* 20750. Aucune des souches de *L. plantarum* étudiées n'a pas révélée une capacité de production d'une bacteriocine.
3. Il a été montré que L-arginine (16.58 %), glycine (16.47 %) et L-acide glutamique (12.68 %) sont dominant dans la composition de bactéries d'*E. italicus* ONU547, glucose (87.77 %) est présente dans la plus grande quantité parmi les sucres, il y a galactose (5.27 %), arabinose (3.38 %), mannose (1.29 %), xylose (1.20 %) et rhamnose (1.09 %), l'acide acétique (87.68 %) domine parmi les acides organiques dans liquide culturel.
4. Le spectre les acides gras a été déterminé et il a été établi que les acides gras saturés de bactéries de la souche *E. italicus* ONU547 composent 31.7 % de la quantité totale, alors que insaturés – 68.3 %, l'acide dodécanoïque (C_{12:0}), l'acide tétradécanoïque (C_{14:0}), l'acide hexadécanoïque (C_{16:0}), l'acide heptadécanoïque (C_{17:0}), l'acide octadécanoïque (C_{18:0}) et l'acide cyclopropanoïque (C_{19:0} cyclo w8c) ont été révélés parmi les acides gras saturés, alors que parmi insaturés – les mélanges d'acides hexadécénoïque (C_{16:1}w7c/C_{16:1}w6c) et d'acides octadécénoïque (C_{18:1}w7c/C_{18:1}w6c) et l'acide eicosénoïque (C_{20:1}w7c).
5. La bacteriocine étudiée a révélée les caractéristiques cationiques et hydrophobes, pendant électrophorèse elle se separe en deux composants avec la masse moléculaire 2 et 3 kDa que peut indiquer la production de deux bacteriocines par la souche *E. italicus* ONU547. Il a été établi que sous l'influence de températures hautes (jusqu'à 121 °C) l'activité de la bacteriocine non purifiée augmente en deux-quatre fois, alors que la bacteriocin purifiée ne change pas sa activité après le traitement thermique. La

batériocine inhibe formation des biofilms par les bactéries indicatrices *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 de 52.5 % et *P. aeruginosa* PAO1 – 48.0 %.

6. Il a été montré pour la première fois que les bactéries de la souche *E. italicus* ONU547 sont capables de former le biofilm sur les surfaces de plantules de cresson alénois, il a été établi leur capacité à former des biofilms par le complexe de bactéries *E. italicus* et *L. plantarum* sur la surface des racines de cresson alénois.
7. Les bactéries de la culture quotidienne d'*E. italicus* ONU547 *in vivo* inhibent la croissance de *R. radiobacter* C58 de 33.3 % et d'*E. carotovora* ZM1 de 24.8 % sur le modèle de explants de carotte.

Liste de publications du candidat par sujet de la thèse

Articles:

1. Merlich AG, Ivanytsia VO, Korotaeva NV, Zlatogurska MA, Vasylieva NYu, Babenko DO, Limanska NV (2013) *Lactobacillus plantarum* from berries of grape cultivated in the south of Ukraine. *Microbiology and Biotechnology* 3:31-39.
2. Limanska N, Korotaeva N, Biscola V, Ivanytsia T, Merlich A, Franco BDGM, Chobert JM, Ivanytsia V and Haertlé T (2015) Study of the potential application of lactic acid bacteria in the control of infection caused by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Pathol Microbiol* 6(8):1-9. doi:10.4172/2157-7471.1000292.
3. Merlich AG, Limanska NV (2016) Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* bacteria, isolated from plant sources of Ukraine and France, against phytopathogenic bacteria. *Microbiology and Biotechnology* 4:71-85. doi: [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2016.4\(36\).86773](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2016.4(36).86773) (Ukrainien).
4. Limanska N, Merlich A, Ivanytsia V (2016) The spread of *Lactobacillus plantarum* in the fermented plant material from Ukraine and France. *Visnyk of the Lviv University. Series Biology* 74:169-174 (Ukrainien).
5. Merlich AG, Zhunko ID, Limanska NV, Ivanytsia VO (2017) Antagonistic activity of metabolic products of bacteria *Lactobacillus plantarum* and *Enterococcus italicus* with joint action against phytopathogenic bacteria. *Microbiology and Biotechnology* 3:45-54. doi: [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2017.3\(39\).110876](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2017.3(39).110876) (Ukrainien).
6. Merlich AG, Zhunko ID, Limanska NV, and Ivanytsia VO (2017) Antagonistic activity against plant pathogenic bacteria and ability to biofilm formation of *Enterococcus italicus* ONU547 bacteria and their consortia with *Lactobacillus plantarum*. *The journal of VN Karazin Kharkiv National University. Series: Biology* 29:71-76 (Ukrainien).
7. Merlich AG, Korotaeva NV (2018) Fatty acid composition of bacteria of *Enterococcus italicus* ONU547 strain. *Microbiology and Biotechnology* 3:75-81. doi: [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2018.3\(43\).142237](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2018.3(43).142237) (Ukrainien).

Liste de communications:

1. Limanska N, Korotaeva N, Biscola V, Ivanytsia T, Basiul O, Choiset Y, Merlich A, Kondratiuk T, Yamborko G, Nazarenko G, Chobert J-M, Ivanytsia V, Haertle T (2013) Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* against crown gall agent. In: Proceedings of the XIII Congress of Ukrainian Microbiological Society, Ialta, 1-6 of October 2013. ARIAL, Simferopol:352.
2. Merlich AG, Samoilenko OL, Limanska NV (2014) Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* against phytopathogenic bacteria. In: Materials of IX International Conference of young scientists “Biology: from molecule to biosphere”, Kharkiv, 18-20 November 2014. FOP Shapovalova TM, Kharkiv:65-66 (Ukrainien).
3. Limanska N, Merlich A, Galkin M, Vasylieva N, Samoilenko O, Filimonov V, Ivanytsia V, Sokol D, Sviridov I (2015) Lactobacilli from plant surfaces: the perspectives for biotechnology. In: Proceedings of the International Conference “Actual problems of microbiology and biotechnology”, Odessa, 1-4 June 2015. Publishing of ONU I.I. Mechnikov, Odessa:21.
4. Limanska NV, Merlich AG, Ivanytsia VIU, Sokol DV, Kruchanova AV (2015). Use of *Lactobacillus plantarum* bacteria as antagonists of phytopathogens. In: Abstracts of International Conference “Integrated protection and quarantine of plants. Perspectives of development in XXI century”, Kyiv, 19-20 November 2015:277-279 (Ukrainien).
5. Limanska N, Merlich A, Ivanytsia V (2016) Effect of *Lactobacillus plantarum* on phytopathogens and plant growth. In: Proceedings of XII International scientific-applied conference “Biotechnology for agriculture and environmental protection”, Odessa, 07-10 September 2016. I.I. Mechnikov Odessa National University, Odessa:138-139.
6. Merlich AG, Galkin MB, Limanska NV, Ivanytsia VO (2016) Activity spectrum of bacteriocin from *Enterococcus italicus* W and its effect on biofilm formation of *Lactobacillus sakei*. In: Proceedings of International Symposium on Cell Biology jointly with 5th Ukrainian Congress for Cell Biology, Odesa, 2-6 October 2016:49 (Ukrainien).
7. Merlich A (2017) Purification of bacteriocin from *Enterococcus italicus* ONU547 by reversed phase-high performance liquid chromatography. In: Proceedings of International conference of young scientists “Modern problems of microbiology and biotechnology”, Odesa, 20-24 June 2017:64-67.
8. Galkin MB, Limanska NV, Merlich AG, Ivanytsia VO (2017) Formation of biofilms of *Lactobacillus plantarum* on plant surfaces and their protecting properties against *Agrobacterium tumefaciens* infection. In: Abstracts of reports of XV Congress of SM Vynogradskyi Microbiology Society of Ukraine, Odessa, 11-15 September 2017. SPOLOM, Lviv:42 (Ukrainien).
9. Limanska NV, Merlich AG, Zhunko ID, Zlatogurska MA, Vasylieva NIu, Kononiuk IuV, Ivanytsia VO (2017) Inhibition of phytopathogens and plant growth stimulation by lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum*. In: Abstracts of reports of XV Congress of SM Vynogradskyi Microbiology Society of Ukraine, Odesa, 11-15 September 2017. SPOLOM, Lviv:277 (Ukrainien).
10. Merlich AG, Galkin MB, Limanska NV, Choiset I, Haertlé T, Ivanytsia VO (2017) Characterization of bacteriocin from *Enterococcus italicus* ONU547, isolated from fermented cabbage of Thailand. In: Abstracts of reports of XV Congress of SM

- Vynogradskyi Microbiology Society of Ukraine, Odesa, 11-15 September, 2017. SPOLOM, Lviv:281 (Ukrainien).
11. Merlich A, Choiset Y, Haertlé T, Ivanytsia V (2017) Molecular mass determination of bacteriocin from *Enterococcus italicus* ONU547 by tricine-SDS-PAGE. In: Abstracts of 7th International Weigl Conference, Lviv, Ukraine, 26-29 September 2017:192.
 12. Limanska NV, Merlich AG, Galkin MB, Zhunko ID, Tesliuk NI, Avramovich I, Ivanytsia VO (2018) Development of preparations based on lactic acid bacteria for protection of plants against phytopathogens. In: Proceedings of the International scientific-practical Conference dedicated to the 100th anniversary of the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine “Biological control in plant protection: achievements and prospects”, Odessa, 1-5 October 2018:197-201 (Ukrainian).
 13. Merlich AG (2018) Formation of biofilms by bacteria of *Enterococcus italicus* ONU547 strain and their complexes with *Lactobacillus plantarum* ONU12 and ONU311 on plants. In: Materials of XIII scientific conference of young scientists dedicated to 100 years of foundation of National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine “Microbiology in modern agricultural production”, Chernigiv, 24-25 October, 2018. Edition of Bragynets OV, Chernigiv:90-91. (Ukrainian).

ABSTRACT

The thesis is dedicated to study of antimicrobial activity of lactic acid bacteria (LAB) isolated from fermented products collected on markets of Ukraine, France and Thailand, to search a bacteriocin producer among them and to study of its characteristics.

108 isolates of lactobacteria from fermented products of plant and animal origin from Ukraine, France and Thailand were studied in order to search of bacteriocin producer. The representatives of the species *L. plantarum* were revealed in percentage 58.3% in must from grape berries from Ukraine and 38.2% - from France. The study of diversity of *L. plantarum* strains isolated from must of grape berries, collected from plantations of Ukraine, according to the results of analysis of profiles of RAPD-PCR showed absence of relationship between origin of the isolates and their genetic profiles in the majority of clusters of constructed dendrogram.

A bacterial strain able to produce a bacteriocin was isolated from Thai fermented cabbage during screening for bacteriocinogenic activity that was identified based on morphological, cultural, physiological, biochemical properties and on sequencing of 16S rRNA gene as *Enterococcus italicus*. This is the first report about isolation of *E. italicus* strain able to produce bacteriocin from plant material.

The study of amino acid spectrum that comprise the bacterial cells of *E. italicus* ONU547 strain showed that L-arginine, glycine and L-glutamic acid are quantitatively dominating in amino acid pool and L-lysine is absent. Glucose is present in the highest amount among identified sugars that comprises 87.7% of the total amount. Galactose (5.2%), arabinose (3.3%), mannose (1.2%), xylose (1.2%) and rhamnose (1.1%) were revealed in lower amount. It was determined that bacteria of *E. italicus* ONU547 strain are able to produce only acetic acid among organic acids. Dodecanoic (C_{12:0}), tetradecanoic (C_{14:0}), hexadecanoic (C_{16:0}), heptadecanoic (C_{17:0}), octadecanoic (C_{18:0}) and cyclopropanoic (C_{19:0}cyclo w8c) acids were revealed among saturated fatty acids, while among unsaturated – mixtures of hexadecenoic (C_{16:1}w7c/C_{16:1}w6c) and octadecenoic acids (C_{18:1}w7c/C_{18:1}w6c) and eicosenoic acid (C_{20:1}w7c). In general, saturated fatty acids of bacteria of *E. italicus* ONU547 strain comprise 31.7% and unsaturated – 68.3%.

It was estimated that bacteria of *E. italicus* ONU547 strain are sensitive to chloramphenicol, rifampicin, levofloxacin, vancomycin, teicoplanin, nitrofurantoin and streptomycin HC. They are moderately sensitive to ciprofloxacin and are resistant to penicillin, ampicillin, erythromycin, tetracycline, gentamicin.

The isolated strain *E. italicus* ONU547 shows inhibitory activity in addition to bacteria of indicator strain *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 that causes spoilage of ham, smoked meat products also against agent of food products spoilage *Brochothrix thermosphacta* DSMZ 20171 and against animal pathogen and opportunistic human pathogen *Listeria ivanovii* subsp. *ivanovii* 20750.

Different methods of extraction and purification were tried for purification and study of properties of bacteriocin that included ammonium sulfate precipitation, hydrophobic, ion-exchange and reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) using different matrixes, apparatus and solvents. The highest activity level of bacteriocin (5120 AU) was reached by combination of hydrophobic and ion-exchange

chromatography. The studied bacteriocin revealed cationic nature and hydrophobicity.

The purified bacteriocin by chromatography during electrophoresis in gel PAGE was separating into two bands exhibited inhibitory activity against *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157. Molecular mass of enterocin from *E. italicus* ONU547 was 2 and 3 kDa as determined by Tricine-SDS-PAGE. It is known from literature data about synthesis of enterocin A and enterocin B with molecular mass near 5 kDa by bacteria of *E. italicus* species (Gaaloul et al. 2014; Aymerich et al. 1996; Casaus et al. 1997). Bacteriocin from strain *E. faecalis* NKR-4-1 (enterocin W) of two components with mass 3256,5 and 2728,6 Da is similar by its molecular mass to bacteriocin from *E. italicus* ONU547 (Sawa et al. 2012).

It was shown for the first time that heating at 80 °C for 30 min, as well as boiling for 15 min increases activity of bacteriocin from supernatant in four times (to 1280 AU/ml) and in the case of autoclaving at 1 atm for 15 min – in twice (640 AU/ml). So, increasing of antimicrobial activity of unpurified bacteriocin is possibly causing by improvement of its solubility as the result of decrease in hydrophobicity when heated. In contrast to unpurified bacteriocin the heating has not influence on activity of purified bacteriocin.

It was showed for the first time that purified enterocin inhibits biofilm formation in *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 and in *P. aeruginosa* PAO1 in 52.5% and 48.0%, respectively.

Bacteriocin from CFS inhibits biofilm formation in *P. aeruginosa* PAO1 in 41.4%.

It was showed that bacteria of *E. italicus* ONU547, *L. plantarum* ONU12 and ONU311 strains are able to form biofilms on surfaces of cress-plants seedlings. Hence, the ability of LAB *E. italicus* to biofilm formation on plant surfaces was firstly showed by us. It was showed the ability to formation of biofilm by bacterial consortia of *E. italicus* and *L. plantarum* on cress-plant surfaces.

It was showed that bacteria of *E. italicus* ONU547 strain inhibit growth of plant pathogenic bacteria *R. radiobacter* C58 and *E. carotovora* ZM1 *in vivo* on carrot explants in 33.3 and 24.8%. Probably, antagonistic activity *in vivo* is causing by high adhesive properties and/or ability to competition for nutrients. It is the first report about inhibitory activity of bacteria of *E. italicus* species against phytopathogens.

Hence, based on the obtained results it is possible to conclude that bacteriocin of *E. italicus* ONU547 because of its antimicrobial properties and resistance to high temperatures can be perspective as food preservative. Enterococci strain and the strains of *L. plantarum* as capable ones together to form the biofilms on plant surfaces and are exhibiting antimicrobial activity against phytopathogenic microorganisms can be recommended for development of biological preparations for plant protection.

АНОТАЦІЯ

Дисертацію присвячено вивченню антимікробної активності молочнокислих бактерій (МКБ), ізольованих з ферментованих продуктів, відібраних на ринках України, Франції та Таїланду, пошуку серед них продуцента бактеріоцину та вивченню його характеристик.

З метою пошуку продуцента бактеріоцину досліджено 108 ізолятів лактобактерій з ферментованих продуктів рослинного та тваринного походження України, Франції та Таїланду. У суслі з ягід винограду України представників виду *L. plantarum* було 58,3%, Франції – 38,2%. Вивчення різноманітності штамів *L. plantarum* із сусла з ягід винограду відібраного на насадженнях України, за результатами аналізу профілів RAPD-ПЛР показало відсутність зв'язку в більшості кластерів побудованої дендрограми між походженням ізолятів та їх генетичними профілями.

У ході скринінгу на наявність бактеріоциногенної активності з ферментованої капусти з Таїланду виділено штам бактерій здатний до продукції бактеріоцину, який ідентифіковано за морфологічними, культуральними, фізіолого-біохімічними властивостями, та секвенування гену 16S рРНК як *Enterococcus italicus*. Це перше повідомлення про виділення штаму *E. italicus*, здатного продукувати бактеріоцин, з рослинного матеріалу.

Визначення складу амінокислот клітин бактерій штаму *E. italicus* ОНУ547, показало, що у пулі амінокислот переважають L-аргінін, гліцин та L-глутамова кислота та відсутній L-лізин.

Серед ідентифікованих цукрів у найбільшій кількості присутня глюкоза, яка складає 87,7% від загальної кількості. У меншій кількості присутні галактоза (5,2%), арабіноза (3,3%), маноза (1,2%), ксилоза (1,2%) та рамноза (1,1%). Визначено, що із органічних кислот бактерії штаму *E. italicus* ОНУ547 здатні до продукції лише оцтової кислоти.

Серед насичених жирних кислот виявлено додеканову ($C_{12:0}$), тетрадеканову ($C_{14:0}$), гексадеканову ($C_{16:0}$), гептадеканову ($C_{17:0}$), октадеканову $C_{18:0}$ та циклопропанову ($C_{19:0}$ цикло w8c) кислоти, тоді як серед ненасичених - суміші гексадеценових ($C_{16:1}w7c/C_{16:1}wbс$) та октадеценових кислот ($C_{18:1} w7c/C_{18:1}wbс$) та ейкозенова кислота ($C_{20:1}w7c$). Загалом насичені жирні кислоти бактерій штаму *E. italicus* ОНУ547 складають 31,7%, а ненасичених – 68,3%.

Встановлено, що бактерії штаму *E. italicus* ОНУ547 чутливі до хлорамфеніколу, рифампіцину, левофлоксацину, ванкоміцину, тейкопланіну, нітрофурантоїну та стрептоміцину НС. Вони середньо чутливі до ципрофлоксацину та резистентні до пеніциліну, ампіциліну, еритроміцину, тетрацикліну та гентаміцину.

Крім бактерій штаму-індикатора *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157, що викликає псування шинки, м'ясних копчених продуктів, ізольований штам *E. italicus* ОНУ547 демонструє інгібувальну активність також проти збудника псування продуктів *Brochothrix thermosphacta* DSMZ 20171 і патогена тварин та умовного патогена людини *Listeria ivanovii* subsp. *ivanovii* 20750 .

Для очищення та вивчення властивостей бактеріоцину було випробувано різні

методи виділення та очищення, що включали преципітацію сульфатом амонію, гідрофобну, іонообмінну та обернено-фазову високоефективну рідинну хроматографію (ОФ-ВЕРХ) за допомогою використання різноманітних матриксів, апаратів та сольвентів. Найвищу активність (5120 ВО) бактеріоцину було отримано за допомогою використання комбінації гідрофобної та іонообмінної хроматографії. Досліджений бактеріоцин виявив катіонну природу та гідрофобність.

Хроматографічно очищений бактеріоцин при електрофорезі у гелі розділявся на дві полоси, які проявили інгібувальну активність до *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157. Молекулярна маса ентероцину *E. italicus* ОНУ547, визначена за допомогою Tricine-SDS-PAGE, складала 2 та 3 кДа. З літературних даних відомо про синтез бактеріями виду *E. italicus* ентероцину А та ентероцину В, молекулярна маса яких складає біля 5 кДа (Gaaloul et al. 2014; Aumerich et al. 1996; Casaus et al. 1997). Подібним за молекулярною масою до бактеріоцину *E. italicus* ОНУ547 є бактеріоцин штаму *E. faecalis* NKR-4-1 (ентероцин W) із двох компонентів з масами 3256,5 та 2728,6 Да (Sawa et al. 2012).

Уперше показано, що нагрівання при 80 °С протягом 30 хв і кип'ятіння впродовж 15 хв, збільшує активність бактеріоцину з надосадової рідини у чотири рази (до 1280 ВО/мл), а у випадку автоклавування при одній атм впродовж 15 хв - в два рази (640 ВО/мл). Отже, збільшення антимікробної активності неочищеного бактеріоцину можливо спричинюється покращенням його розчинності в результаті зменшення гідрофобності під впливом нагрівання. На відміну від неочищеного бактеріоцину нагрівання не впливало на активність очищеного бактеріоцину.

Вперше показано, що очищений ентероцин інгібує утворення біоплівки *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 і *P. aeruginosa* PAO1 на 52,5% та 48,0%, відповідно.

Бактеріоцин з НОР пригнічує біоплівкоутворення *P. aeruginosa* PAO1 на 41,4%.

Показано, що бактерії штамів *E. italicus* ОНУ547, *L. plantarum* ОНУ12 та ОНУ311 здатні до утворення біоплівок на поверхнях проростків крес-салату. Отже нами вперше показано здатність МКБ *E. italicus* до утворення біоплівок на поверхні рослин. Показано здатність до утворення біоплівок консорціумами бактерій *E. italicus* та *L. plantarum* на поверхнях рослин крес-салату.

Показано, що бактерії штаму *E. italicus* ОНУ547 інгібують ріст фітопатогенних бактерій *R. radiobacter* C58 та *E. carotovora* ZM1 *in vivo* на експлантах моркви на 33,3 та 24,8%. Ймовірно, антагоністична активність *in vivo* забезпечується високими адгезивними властивостями та/або здатністю до конкуренції за поживні речовини. Це перше повідомлення про інгібувальну активність бактерій виду *E. italicus* проти фітопатогенів.

Отже, на основі отриманих результатів можна зробити висновок, що бактеріоцин *E. italicus* ОНУ547 завдяки своїм антимікробним властивостям та стійкості до високих температур може бути перспективним як харчовий консервант. Штам *E. italicus* ОНУ547 та штами *L. plantarum*, які разом здатні до утворення біоплівок на поверхнях рослин та проявляють антимікробну активність проти фітопатогенних мікроорганізмів можуть бути рекомендовані для розробки біологічних препаратів для захисту рослин.

Список публікацій здобувача за темою дисертації

Статті:

- 1) Merlich AG, Ivanytsia VO, Korotaeva NV, Zlatogurska MA, Vasylieva NYu, Babenko DO, Limanska NV (2013) *Lactobacillus plantarum* from berries of grape cultivated in the south of Ukraine. *Microbiology and Biotechnology* 3:31-39.
- 2) Limanska N, Korotaeva N, Biscola V, Ivanytsia T, Merlich A, Franco BDGM, Chobert JM, Ivanytsia V and Haertlé T (2015) Study of the potential application of lactic acid bacteria in the control of infection caused by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Pathol Microbiol* 6(8):1-9. doi:10.4172/2157-7471.1000292.
- 3) Merlich AG, Limanska NV (2016) Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* bacteria, isolated from plant sources of Ukraine and France, against phytopathogenic bacteria. *Microbiology and Biotechnology* 4:71-85. doi: [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2016.4\(36\).86773](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2016.4(36).86773) (Ukrainian).
- 4) Limanska N, Merlich A, Ivanytsia V (2016) The spread of *Lactobacillus plantarum* in the fermented plant material from Ukraine and France. *Visnyk of the Lviv University. Series Biology* 74:169-174 (Ukrainian).
- 5) Merlich AG, Zhunko ID, Limanska NV, Ivanytsia VO (2017) Antagonistic activity of metabolic products of bacteria *Lactobacillus plantarum* and *Enterococcus italicus* with joint action against phytopathogenic bacteria. *Microbiology and Biotechnology* 3:45-54. doi: [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2017.3\(39\).110876](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2017.3(39).110876) (Ukrainian).
- 6) Merlich AG, Zhunko ID, Limanska NV, and Ivanytsia VO (2017) Antagonistic activity against plant pathogenic bacteria and ability to biofilm formation of *Enterococcus italicus* ONU547 bacteria and their consortia with *Lactobacillus plantarum*. *The journal of VN Karazin Kharkiv National University. Series: Biology* 29:71-76 (Ukrainian).
- 7) Merlich AG, Korotaeva NV (2018) Fatty acid composition of bacteria of *Enterococcus italicus* ONU547 strain. *Microbiology and Biotechnology* 3:75-81. doi: [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2018.3\(43\).142237](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2018.3(43).142237) (Ukrainian).

Тези доповідей на конференціях:

- 1) Limanska N, Korotaeva N, Biscola V, Ivanytsia T, Basiul O, Choiset Y, Merlich A, Kondratiuk T, Yamborko G, Nazarenko G, Chobert J-M, Ivanytsia V, Haertle T (2013) Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* against crown gall agent. In: *Proceedings of the XIII Congress of Ukrainian Microbiological Society, Ialta, 1-6 of October 2013. ARIAL, Simferopol:352.*
- 2) Merlich AG, Samoilenko OL, Limanska NV (2014) Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* against phytopathogenic bacteria. In: *Materials of IX International Conference of young scientists "Biology: from molecule to biosphere", Kharkiv, 18-20 November 2014. FOP Shapovalova TM, Kharkiv:65-66 (Ukrainian).*
- 3) Limanska N, Merlich A, Galkin M, Vasylieva N, Samoilenko O, Filimonov V, Ivanytsia V, Sokol D, Sviridov I (2015) Lactobacilli from plant surfaces: the perspectives for biotechnology. In: *Proceedings of the International Conference "Actual problems of microbiology and biotechnology", Odessa, 1-4 June 2015. Publishing of ONU I.I. Mechnikov, Odessa:21.*

- 4) Limanska NV, Merlich AG, Ivanytsia VIU, Sokol DV, Kruchanova AV (2015). Use of *Lactobacillus plantarum* bacteria as antagonists of phytopathogens. In: Abstracts of International Conference “Integrated protection and quarantine of plants. Perspectives of development in XXI century”, Kyiv, 19-20 November 2015:277-279 (Ukrainian).
- 5) Limanska N, Merlich A, Ivanytsia V (2016) Effect of *Lactobacillus plantarum* on phytopathogens and plant growth. In: Proceedings of XII International scientific-applied conference “Biotechnology for agriculture and environmental protection”, Odessa, 07-10 September 2016. I.I. Mechnikov Odessa National University, Odessa:138-139.
- 6) Merlich AG, Galkin MB, Limanska NV, Ivanytsia VO (2016) Activity spectrum of bacteriocin from *Enterococcus italicus* W and its effect on biofilm formation of *Lactobacillus sakei*. In: Proceedings of International Symposium on Cell Biology jointly with 5th Ukrainian Congress for Cell Biology, Odesa, 2-6 October 2016:49 (Ukrainian).
- 7) Merlich A (2017) Purification of bacteriocin from *Enterococcus italicus* ONU547 by reversed phase-high performance liquid chromatography. In: Proceedings of International conference of young scientists “Modern problems of microbiology and biotechnology”, Odesa, 20-24 June 2017:64-67.
- 8) Galkin MB, Limanska NV, Merlich AG, Ivanytsia VO (2017) Formation of biofilms of *Lactobacillus plantarum* on plant surfaces and their protecting properties against *Agrobacterium tumefaciens* infection. In: Abstracts of reports of XV Congress of SM Vynogradskyi Microbiology Society of Ukraine, Odessa, 11-15 September 2017. SPOLOM, Lviv:42 (Ukrainian).
- 9) Limanska NV, Merlich AG, Zhunko ID, Zlatogurska MA, Vasylieva NI, Kononiuk IuV, Ivanytsia VO (2017) Inhibition of phytopathogens and plant growth stimulation by lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum*. In: Abstracts of reports of XV Congress of SM Vynogradskyi Microbiology Society of Ukraine, Odesa, 11-15 September 2017. SPOLOM, Lviv:277 (Ukrainian).
- 10) Merlich AG, Galkin MB, Limanska NV, Choiset I, Haertlé T, Ivanytsia VO (2017) Characterization of bacteriocin from *Enterococcus italicus* ONU547, isolated from fermented cabbage of Thailand. In: Abstracts of reports of XV Congress of SM Vynogradskyi Microbiology Society of Ukraine, Odesa, 11-15 September, 2017. SPOLOM, Lviv:281 (Ukrainian).
- 11) Merlich A, Choiset Y, Haertlé T, Ivanytsia V (2017) Molecular mass determination of bacteriocin from *Enterococcus italicus* ONU547 by tricine-SDS-PAGE. In: Abstracts of 7th International Weigl Conference, Lviv, Ukraine, 26-29 September 2017:192.
- 12) Limanska NV, Merlich AG, Galkin MB, Zhunko ID, Tesliuk NI, Avramovich I, Ivanytsia VO (2018) Development of preparations based on lactic acid bacteria for protection of plants against phytopathogens. In: Proceedings of the International scientific-practical Conference dedicated to the 100th anniversary of the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine “Biological control in plant protection: achievements and prospects”, Odessa, 1-5 October 2018:197-201 (Ukrainian).
- 13) Merlich AG (2018) Formation of biofilms by bacteria of *Enterococcus italicus* ONU547 strain and their complexes with *Lactobacillus plantarum* ONU12 and

ONU311 on plants. In: Materials of XIII scientific conference of young scientists dedicated to 100 years of foundation of National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine “Microbiology in modern agricultural production”, Chernigiv, 24-25 October, 2018. Edition of Bragynets OV, Chernigiv:90-91. (Ukrainian).

ЗМІСТ	
RÉSUMÉ	4
ABSTRACT	12
АНОТАЦІЯ	14
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	21
ВСТУП	22
РОЗДІЛ 1.	
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	28
1.1. Загальна характеристика молочнокислих бактерій.....	28
1.2. Антимікробні сполуки лактобактерій	31
1.3. Антагоністична активність молочнокислих бактерій щодо патогенних бактерій.....	42
1.4.Застосування молочнокислих бактерій.....	48
РОЗДІЛ 2.	
МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	50
2.1. Досліджувані штами мікроорганізмів.....	50
2.2.Вивчення генетичного різноманіття ізолятів МКБ на основі профілів RAPD-ПЛР.....	52
2.3. Скринінг на продукцію бактеріоцинів.....	52
2.4. Вивчення властивостей та ідентифікація штаму-продуцента бактеріоцину.....	53
2.4.1. Визначення вмісту амінокислот.....	54
2.4.2. Вивчення складу цукрів бактерій штаму <i>E. italicus</i> ОНУ547.....	54
2.4.3. Аналіз складу органічних кислот.....	55
2.4.4. Визначення спектру жирних кислот.....	55
2.4.5. Визначення чутливості до антибіотиків.....	56
2.4.6. Сиквенування гену 16 S рРНК.....	56
2.5. Визначення антимікробного спектру бактеріоцина.....	57
2.6. Виділення та очищення бактеріоцину.....	58
2.7. Вплив температури на активність бактеріоцину.....	60
2.8. Визначення молекулярної маси бактеріоцину	60

2.9. Вплив бактеріоцину на утворення біоплівок та планктонні клітини.....	61
2.10. Вивчення антимікробної активності бактерій <i>E. italicus</i> ОНУ547 та їх сумішей з <i>L. plantarum</i> до фітопатогенних бактерій <i>in vivo</i>	62
2.11. Визначення здатності МКБ до утворення біоплівок на поверхнях рослин.....	63

РОЗДІЛ 3.

БАКТЕРІОЦИНОГЕННА АКТИВНІСТЬ ІЗОЛЯТІВ МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ.....

64

3.1. Вивчення ізолятів молочнокислих бактерій з різних географічних зон.....	64
--	----

3.2. Скринінг штамів МКБ на продукцію бактеріоцинів.....	66
--	----

3.3. Ідентифікація та характеристика штама-продуцента бактеріоцину.....	67
---	----

РОЗДІЛ 4.

ВИДІЛЕННЯ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРІОЦИНУ *E. ITALICUS* ОНУ547.....

87

4.1. Спектр антимікробної дії бактеріоцину <i>E. italicus</i> ОНУ547.....	87
---	----

4.2. Виділення та очищення бактеріоцину.....	89
--	----

4.3. Вплив температури на активність бактеріоцину.....	94
--	----

4.4. Молекулярна маса бактеріоцину.....	96
---	----

4.5. Вплив бактеріоцину на утворення біоплівок бактеріями тест-штамів.....	98
--	----

РОЗДІЛ 5.

УТВОРЕННЯ БІОПЛІВКИ БАКТЕРІЯМИ *E. ITALICUS* ОНУ547 НА ПОВЕРХНЯХ РОСЛИН.....

106

РОЗДІЛ 6.

АНТИМІКРОБНА АКТИВНІСТЬ *E. ITALICUS* ОНУ547 У ДОСЛІДАХ *IN VIVO*

111

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.....

116

ВИСНОВКИ.....

122

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА.....

124

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ВО – відносні одиниці

ДСН – додецилсульфат натрію

МКБ - молочнокислі бактерії

НОР - надосадова рідина

ОЩ – оптична щільність

ОФ-ВЕРХ - обернено-фазова високоефективна рідинна хроматографія

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

П.н. – пара нуклеотидів

ЧОБ – частково очищений бактеріоцин

QS – кворум сенсинг

ВСТУП

Актуальність теми. Шкідливі мікроорганізми призводять до значних економічних втрат, а хімічні речовини, які застосовують для боротьби з ними, можуть мати негативний вплив як на різні рослинні та тваринні організми, так і на людину (Kazempour et al. 2010; Murthy et al. 2012; Griffiths 1981). В якості можливих шляхів вирішення цих важливих проблем актуальним є використання молочнокислих бактерій (МКБ) або продуктів їх метаболізму, що мають антимікробну активність проти патогенних, псувних та фітопатогенних мікроорганізмів (Perez et al. 2014; Василюк та ін. 2014а). Представники групи МКБ, включаючи ентерококи та лактобацили, використовують як пробіотики, які не тільки не несуть шкоди для здоров'я людини, а й є корисними (Gayathri et al. 2011; Franz et al. 2011). Пригнічувальна активність проти патогенних та псувних мікроорганізмів є характерною для МКБ, що підтверджує їх застосування у сільському господарстві, ветеринарній медицині, медицині, та харчовій індустрії (Василюк та ін. 2014а; Trias et al. 2008; Djadouni and Kihal 2012; Amel et al. 2015; Arena et al. 2016).

МКБ продукують широке коло сполук, що пригнічують ріст інших мікроорганізмів. До них належать органічні кислоти, бактеріоциноподібні сполуки, бактеріоцини, перекис водню, сідерофори, біосурфактанти (Visser and Holzappel 1992; Atrih et al. 2001; Audisio et al. 2005; Gupta et al. 2010; Aguilar and Klotz 2010; Klewicka and Libudzisz 2004; Shrestha et al. 2014; Rodridues et al. 2004). Незважаючи на широке коло метаболітів МКБ, в наш час інтенсивно вивчаються саме бактеріоцини, які є пептидами з антимікробною активністю, у зв'язку з чим вони вважаються можливим доповненням до антибіотиків та застосовуються в харчовій промисловості як консерванти (Perez et al. 2014).

Крім важливого прикладного значення, дослідження представників групи МКБ та їх продуктів метаболізму з антагоністичною активністю важливе також з точки зору фундаментальних досліджень, оскільки бактерії далеко не всіх видів МКБ є вивченими на предмет складу та характеристик їх антимікробних метаболітів. Це ж стосується і представників виду *Enterococcus italicus* (Gaaloul et al 2014).

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Роботу

виконано в межах науково-дослідних тем кафедри Мікробіології, вірусології та біотехнології та Біотехнологічного науково-навчального центру Одеського національного університету імені І.І. Мечникова: держбюджетної теми №М/117-2015 «Взаємодія молочнокислих бактерій з сільськогосподарськими рослинами» (державний реєстраційний номер роботи 0115U003991), держбюджетної теми №477 «Розробити наукові підходи та нові засоби біологічного контролю за збудниками бактеріальних інфекцій рослин з використанням молочнокислих бактерій» (державний реєстраційний номер роботи 0111U001382), держбюджетної теми №543 «Вивчити різноманітність та механізми взаємодії лактобацил з різних географічних зон з іншими організмами та розробити біопрепарати для стимуляції росту рослин та їх ферментування» (державний реєстраційний номер роботи 0217U004354), теми №М/201-2012 «Вивчення захисної дії лактобацил пробіотиків проти інфекцій харчових продуктів та рослин» (державний реєстраційний номер роботи 0112U005257) спільного з Інститутом сільського господарства INRA (м. Нант) за Програмою спільних дій між Україною і Францією в галузі науково-технологічного співробітництва «Дніпро».

Мета і завдання дослідження. Метою дослідження було вивчення антимікробної активності молочнокислих бактерій, ізольованих з ферментованих продуктів рослинного походження відібраних на ринках України, Франції, Таїланду, пошук серед них продуцента бактеріоцину та вивчення його характеристик.

До завдань дослідження входило:

1. Дослідити ізоляти молочнокислих бактерій із ферментованих продуктів рослинного та тваринного походження України, Франції та Таїланду.
2. Вивчити генетичну різноманітність ізолятів *L. plantarum*, за результатами аналізу профілів RAPD-ПЛР.
3. Здійснити скринінг штамів молочнокислих бактерій та відібрати продуцент бактеріоцину.
4. Вивчити тинкторіальні, морфологічні, культуральні, фізіолого-біохімічні та молекулярно-біологічні характеристики та ідентифікувати продуцент бактеріоцину.

5. Відпрацювати методи виділення та очищення бактеріоцину і визначити його властивості.
6. Дослідити вплив бактеріоцину на формування біоплівки індикаторними мікроорганізмами.
7. Встановити здатність бактерій, що продукують бактеріоцин, до утворення біоплівки на поверхнях проростків рослин крес-салату.
8. Вивчити антимікробну активність молочнокислих бактерій штаму продуцента бактеріоцину до патогенних мікроорганізмів у дослідках *in vivo*.

Об'єкт дослідження – взаємовідносини молочнокислих бактерій з іншими мікроорганізмами та рослинами.

Предмет дослідження – антимікробні властивості молочнокислих бактерій до патогенних та псувних бактерій.

Методи дослідження – мікробіологічні, молекулярно-біологічні, біохімічні.

Наукова новизна одержаних результатів. У результаті проведених досліджень із ферментованих продуктів рослинного та тваринного походження ізолювано та вивчено фізіолого-біохімічні особливості, біохімічний склад, молекулярно-біологічні ознаки штаму *E. italicus* продуцента бактеріоцину, який виділено, очищено та визначено його властивості.

Вивчення генетичної різноманітності штамів *L. plantarum*, ізолюваних із суслу з ягід, зібраних з виноградників України, за результатами аналізу профілів RAPD-ПЛР показало відсутність зв'язку між походженням ізолятів та їх генетичними профілями. Жоден із досліджених штамів *L. plantarum* не виявив здатності до продукції бактеріоцинів.

Вперше серед мікробіоти ферментованих продуктів рослинного походження виявлено та виділено штам *E. italicus* ОНУ547 продуцент бактеріоцину. Встановлено, що бактеріоцин пригнічує ріст бактерій *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 та *Brochothrix thermosphacta* DSMZ 20171 збудників псування м'ясних продуктів і патогена тварин та умовного патогена людини *Listeria ivanovii* subsp. *ivanovii* 20750.

Досліджений бактеріоцин має катіонну природу та високу гідрофобність. Показано, що частково очищений бактеріоцин при електрофорезі розділяється на два компоненти, які пригнічують ріст бактерій тест-штаму *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157. Молекулярна маса розділених бактеріоцинів складає 2 та 3 кДа, що може вказувати на можливість продукції бактеріями *E. italicus* ОНУ547 двох бактеріоцинів, відмінних від ентероцину А та ентероцину В, виявлених для *E. italicus* GGN10 (Gaaloul et al. 2014).

Встановлено, що за впливу високих температур (до 121 °С) активність неочищеного бактеріоцину зростає до чотирох раз, в той час як очищений бактеріоцин не змінює своєї активності після температурної обробки. Бактеріоцин пригнічує утворення біоплівок бактеріями індикаторами *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 на 52,5% та *P. aeruginosa* PAO1 - на 48,0%.

Вперше показано, що бактерії штаму *E. italicus* ОНУ547 здатні утворювати моновидову та полівидову біоплівку у комплексі з бактеріями *L. plantarum* на поверхні проростків рослин крес-салату.

Бактерії добової культури *E. italicus* ОНУ547 пригнічують ріст бактерій *R. radiobacter* C58 та *Erwinia carotovora* ZM1 *in vivo* на експлантах моркви на 33,3 та 24,8%, відповідно. Бактерії *E. italicus* ОНУ547 за сумісної дії з бактеріями штамів *L. plantarum* ОНУ12 та ОНУ311 у більшості випадків проявляють вищу антагоністичну активність проти фітопатогенів *in vivo* ніж ентерокок окремо.

Практичне значення одержаних результатів. Бактерії штамів *E. italicus* ОНУ547 та їх комплекси з *L. plantarum* ОНУ12 та *L. plantarum* ОНУ311, що проявили інгібувальну активність проти фітопатогенних бактерій, можуть бути перспективними для створення екологічно чистих біопрепаратів для захисту рослин, а бактеріоцин штаму *E. italicus* ОНУ547 - для розробки ефективного антимікробного засобу для застосування в медицині, ветеринарії та харчовій промисловості як консервуючий агент. Матеріали роботи використано курсів на кафедрі мікробіології, вірусології та біотехнології Одеського національного університету імені І.І. Мечникова при викладанні: «Прикладна мікробіологія», «Мікробні біотехнології», «Біоплівки», «Антибіотики».

Особистий внесок здобувача. Основний обсяг експериментальної роботи, статистичну обробку та аналіз результатів здійснено здобувачем особисто: проведено виділення нових ізолятів МКБ з ферментованих продуктів України і Таїланду, здійснено скринінг виділених ізолятів на здатність до продукції бактеріоцинів, виявлено штам-продуцент бактеріоцину, вивчено його культуральні та фізіолого-біохімічні властивості, досліджено спектр активності бактеріоцину проти індикаторних мікроорганізмів, визначено його молекулярну масу.

Планування та аналіз результатів виконано спільно з науковими керівниками проф. Т. Ертле та проф. В. Іваницею, концентрування та очистку бактеріоцину, вивчення впливу температур на його активність виконано спільно з Yvan Choiset, ПЛР для ідентифікації до виду продуцента бактеріоцину - з Dr Vanessa Biscola (INRA, VIA, FIPL, Нант, Франція). Виготовлення препарату для здійснення електронної мікроскопії було виконано у співпраці з м.н.с. відділу молекулярної генетики бактеріофагів Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного Златогурською М.А, аналіз складу амінокислот, цукрів та органічних кислот у співробітництві з к.б.н. Хархотою М.А. у Центрі колективного користування унікальним науковим обладнанням при ІМБ НАНУ та к.б.н. Остапчуком А.М. у Біотехнологічному науково-навчальному центрі ОНУ, визначення жирнокислотного складу проведено в ОНУ спільно з м.н.с. Коротаєвою Н.В., дослідження антагоністичної активності штамів МКБ проти фітопатогенних бактерій *in vivo* спільно з к.б.н. Ліманською Н.В та к.б.н. Жунько І.Д., RAPD-ПЛР та кластерний аналіз виконано у співробітництві з к.б.н. Ліманською Н.В та к.б.н. Васильєвою Н.Ю., здатність МКБ до утворення біоплівки на рослинних поверхнях - спільно з к.б.н. Галкіним М.Б. Автор висловлює щире подяку к.б.н. Ліманській Н.В. за допомогу і співпрацю та за надані ізоляти *L. plantarum*, виділені з рослинного матеріалу Франції, Dr Noraphat Hwanhlem за надані тест-штами для здійснення скринінгу лактобактерій на наявність бактеріоциногенної активності, чл.-кор. НАНУ Коваленко Н.К. за референтні штами бактерій *L. plantarum*, чл.-кор. НАНУ Товкачу Ф.І. за наданий штам *Erwinia carotovora* ZM1, д.б.н. Патиці М.В. за надані штами фітопатогенних псевдомонад.

Автор висловлює щирю подяку Міністерству закордонних справ Франції за фінансову допомогу для проведення цього дисертаційного дослідження.

Апробація результатів дисертації. Результати проведеної роботи доповідалися на конференціях та з'їздах: XIII з'їзд Товариства мікробіологів України імені С.М. Виноградського (Ялта, 1–6 жовтня, 2013), IX міжнародна конференція молодих учених «Біологія: від молекули до біосфери» (Харків, Україна, 18–20 листопада, 2014), Міжнародна конференція молодих науковців «Actual Problems of Microbiology and Biotechnology» (Одеса, Україна, 1–4 червня, 2015), міжнародна конференція «Інтегрований захист та карантин рослин. Перспективи розвитку в XXI столітті» (Київ, Україна, 19–20 листопада, 2015), XII міжнародна науково-прикладна конференція «Biotechnology for agriculture and environmental protection» (Одеса, Україна, 07–10 вересня, 2016), Міжнародний симпозіум по клітинній біології (Одеса, Україна, 2–6 жовтня, 2016), Міжнародна конференція молодих науковців «Modern problems of microbiology and biotechnology» (Одеса, Україна, 20–24 червня, 2017), XV з'їзд товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського (Одеса, 11-15 вересня, 2017), VII міжнародна Вейглівська конференція (Львів, Україна, 26–29 вересня, 2017), Міжнародній науково-практичній конференції з нагоди 100-річчя Національної академії аграрних наук України «Біологічний метод захисту рослин: досягнення і перспективи» (Одеса, 01-05 жовтня, 2018), XIII науковій конференції молодих вчених, присвяченій 100-річчю з дня заснування національної академії аграрних наук України «Мікробіологія в сучасному сільськогосподарському виробництві» (Чернігів, 24-25 жовтня, 2018).

Публікації. За матеріалом дисертації опубліковано 20 наукових праць, з яких 2 статті у журналах, що входять до науково метричної бази WoS, 5 статей у виданнях ВАК та 13 тез доповідей у матеріалах міжнародних наукових конференцій.

Структура та обсяг роботи. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, експериментальної частини, яка містить 4 розділи, узагальнення, висновки та список цитованої літератури, що включає 246 джерел. Основний зміст роботи викладено на 150 сторінках машинописного тексту. Ілюстративний матеріал подано у вигляді 28 рисунків та 13 таблиць.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальна характеристика молочнокислих бактерій

За своїм таксономічним положенням МКБ відносяться до фірмікутів, класу *Bacillus*, порядку *Lactobacillales*. До цього порядку входять шість родин: *Lactobacillaceae*, *Enterococcaceae*, *Aerococcaceae*, *Streptococcaceae*, *Carnobacteriaceae* та *Leuconostocaceae* (de Vos et al. 2009).

Бактерії представники цього порядку мають клітинну стінку грампозитивного типу, за своєю морфологією є паличками або коками, нездатні до спороутворення, проявляють негативну реакцію на каталазу, по відношенню до кисню є аеротолерантними, оскільки не використовуючи кисень, вони в певній мірі стійкі до нього за рахунок пероксидази (de Vos et al. 2009). У МКБ відсутній механізм окиснювального фосфорилування. Ці мікроорганізми здійснюють свій енергетичний метаболізм шляхом зброджування цукрів та утворюють АТФ шляхом субстратного фосфорилування, основним продуктом при цьому є лактат (Pessione 2012). Представники цієї групи здатні до утилізації таких вуглеводів як глюкоза, лактоза, цукроза, мальтоза, маноза, фруктоза, галактоза, крохмаль, декстрин зброджуючи їх гомоферментативним, головним продуктом якого є молочна кислота або гетероферментативним шляхом, в результаті якого крім лактату утворюються етиловий спирт та ацетат, які продукуються в значній кількості (Квасніков і Нестеренко 1975).

Для МКБ є характерною резистентність до деяких антибіотиків та може спостерігатися її зміна під впливом різних факторів (Рибалко та ін. 2006).

У наукових публікаціях повідомляється про здатність лактобактерій до біоплівкоутворення, у тому числі до формування полівидових біоплівок (Kubota et al. 2008; Kawarai et al. 2007).

МКБ виділяють із різноманітних середовищ, таких як кишковик людини і тварин, ризосфера рослин (Pidgorskyi et al. 2016; Lim et al. 2004; Balasingham et al. 2017; Vela Gurovic et al. 2014; Lutz et al. 2012; Fhoula et al. 2013), молочні продукти, сире м'ясо (Franciosi et al. 2015; Lengkey et al. 2009), силос (Pholsen et al. 2016), ґрунт

(Lutz et al. 2012), свіжі овочі та фрукти (Trias et al. 2008), пшеничні хлібні закваски (De Vuyst et al. 2002).

Однією з практично важливих родин МКБ є родина *Lactobacillaceae*, до складу якої входять роди *Lactobacillus*, *Pediococcus* та *Paralactobacillus* (de Vos et al. 2009).

За своєю морфологією лактобацили є паличками розміром 0,5-1,2 x 1,0-10,0 мкм. Загалом нерухомі, але іноді зустрічаються бактерії деяких видів, які рухливі завдяки наявності джгутиків, що розміщені перитрихіяльно. Найкраще ростуть у діапазоні температур 30-40 °C. На середовищах з агаром утворюють непрозорі, непігментовані, випуклі колонії з цільним краєм з розміром 2-5 мм в діаметрі (Хоулт та ін. 1997). Здатні до утворення ланцюжків, не продукують спор та характеризуються ферментативним метаболізмом. Відомо, що для метаболізму карбону у цієї групи мікроорганізмів характерно утворення молочної кислоти, яка складає половину кінцевих продуктів, тоді як решта може бути представлена етанолом, оцтовою кислотою, сукцинатом або форміатом. Вони не утворюють каталазу, оксидазу та не мають цитохромів, характеризуються складними потребами щодо поживних речовин, тому для них необхідна присутність у середовищі культивування таких компонентів як вуглеводи, пептиди, амінокислоти, вітаміни, жирні кислоти та їх естери, солі та похідні нуклеїнових кислот (de Vos et al. 2009).

До роду *Lactobacillus* входить вид *Lactobacillus plantarum*, для якого було описано наявність двох підвидів – *L. plantarum* subsp. *argentoratensis* та *L. plantarum* subsp. *plantarum* (de Vos et al. 2009; Bringel et al. 2005). Бактерії обох підвидів мають майже однакові морфологічні та фізіолого-біохімічні властивості (лише *L. plantarum* subsp. *argentoratensis* на відміну від *L. plantarum* subsp. *plantarum* нездатні утворювати кислоти з метил α -D-манозиду та мелезітози) та відрізнити їх між собою можна лише на генетичному рівні (Bringel et al. 2005).

За своєю морфологією бактеріальні клітини виду *L. plantarum* є прямими паличками з заокругленими кінцями розміром (0,9-1,2 x 3-8 мкм) (de Vos et al. 2009). Розмір хромосоми може складати 3,3-3,4 Мб (Chevallier et al. 1994). Вміст G-C пар ДНК - 44-46 моль%. *L. plantarum* мають метаболізм факультативно

гетероферментативного типу (de Vos et al. 2009), здатні до згортання молока, швидкість якого залежить від джерела виділення (Василюк та ін. 2014b).

Для культивування вони потребують таких факторів росту як ніацин та пантотенат кальцію, яблочна кислота та навіть деякі мінерали глинистої природи (монтморилоніт, каолінит) стимулюють їх ріст, тоді як вітамін B12, піридоксаль або піридоксамін, тіамін, дезоксирибозиди, тимідин та фолієва кислота не є необхідними для їх росту (de Vos et al. 2009; Passos et al. 2003; Гармашева та ін. 2016).

Додавання до бактерій *L. plantarum* MRS та таких кріопротекторів як желатин та сахароза (1:2:1) з подальшою заморозкою забезпечують ефективно довгострокове зберігання бактерій цього виду (Коваленко та ін. 2017).

Для бактеріальних клітин *L. plantarum* характерна здатність до утворення біоплівки (Kachouri et al. 2016; Kubota et al. 2008). Бактерії виду *L. plantarum*, як і інших видів МКБ, населяють різні екологічні ніші, такі як кисломолочні продукти (кисле молоко, сир, бринза, сметана), харчові продукти іншого походження, ферментовані рослинні продукти (квашені огірки, капуста, яблука, помідори), а також зустрічається на рослинних плодах, у молоці (Siezen and van Hylckama Vlieg 2011; Pal et al. 2004-2005; Bordignon Junior et al. 2010; Василюк та ін. 2014a; Trias et al. 2008; Sumathi and Reetha 2012). Бактерії цього виду населяють рослинні поверхні (Lin et al. 1992; Minervini et al. 2015; Fhoula et al. 2013), кишковик людини (Uraipan and Hongpattarakere 2015), бджолині пилкові зерна (Belhadj et al. 2014).

Ще однією родиною МКБ, представники якої привертають увагу дослідників, є родина *Enterococcaceae* до складу якої входять роди *Enterococcus*, *Melissococcus*, *Vagococcus* та *Tetragenococcus* (de Vos et al. 2009).

Представники роду *Enterococcus* зустрічаються у ферментованих продуктах, шлунково-кишковому тракті людини і тварин, воді, ґрунті, рослинах (Гармашева та ін. 2018; Гармашева та ін. 2009; Lebreton et al. 2014), у молоці ссавців (Jiménez et al. 2013), виділяються від комах (Audisio et al. 2005).

Клітини ентерококів мають овоїдну форму, грампозитивні, проявляють високу стійкість до висушування. Цікаво, що бактеріальні клітини деяких видів можуть мати джгутики. По відношенню до кисню є анаеробними та

каталазонегативними. Ентерококи хемоорганогетеротрофи, мають метаболізм гомоферментативного типу. Оптимальна температура для росту складає 35-37 °С, деякі здатні рости в діапазоні 10-45 °С (de Vos et al. 2009).

До групи ентерококів входять два види МКБ зі слабкою біохімічною активністю: *E. italicus* та *Enterococcus camelliae*. Вид відомий раніше як *Enterococcus saccharominimus* було перекласифіковано в *E. italicus* (de Vos et al. 2009). Вид *E. italicus* належить до роду *Enterococcus*, родини *Enterococcaceae*, порядку *Lactobacillales*, класу *Bacilli*, типу *Firmicutes* (<http://www.tgw1916.net/Streptococcus/italicus.html>). Розміри бактеріальних клітин цього виду варіюють, за своєю формою є коками або мають овальну форму, розміщуються у коротких ланцюжках або попарно (Vancanneyt et al. 2004; Fortina et al. 2004). Не продукують пігментів, на агаризованому середовищі М17 утворюють круглої форми колонії з діаметром один мм, які мають білувато-сірий колір (Fortina et al. 2004). На агаризованому середовищі Колумбія, що містить овечу кров, утворюють колонії діаметром 2 мм. Оптимальними температурами для росту є 30 °С - 37 °С (Vancanneyt et al. 2004; Fortina et al. 2004). Здатні рости в присутності NaCl в концентрації 5%, коли вона досягає 6% то до росту є здатними бактерії не всіх штамів. Проявляють здатність до росту в середовищі з лужним значенням рН (9,6). При рості на кров'яному агарі спричиняють α -гемоліз. Антибіотик ванкоміцин пригнічує їх ріст (Fortina et al. 2004).

1. 2. Антимікробні сполуки лактобактерій

В багатьох наукових публікаціях описано антагоністичні властивості бактерій групи МКБ проти різноманітних патогенних, умовно-патогенних та псувних мікроорганізмів. Такий широкий спектр пригнічувальної активності лактобактерій до інших мікроорганізмів можна пояснити різноманіттям сполук, що пригнічують ріст та розвиток інших мікроорганізмів. Встановлено, що спектр цієї активності може залежати як від штаму антагоніста так і від штаму індикатора (Гармашева та ін. 2015). Органічні кислоти, які лактобактерії виділяють як кінцеві продукти матаболізму вуглеводів, такі як молочна та оцтова є найбільш відомими серед

антагоністичних сполук цієї групи мікроорганізмів (Гармашева та ін. 2015; Visser and Holzapfel 1992). Висунуто припущення про можливість лактобактерій продукувати азелаїнову кислоту (Broberg et al. 2007). Крім органічних кислот лактобактерії здатні виділяти такі сполуки з пригнічувальною активністю як бактеріоцини, бактеріоциноподібні сполуки, перекис водню, сидерофори, біосурфактанти (Atrih et al. 2001; Audisio et al. 2005; Gupta et al. 2010; Aguilar and Klotz 2010; Klewicka and Libudzisz 2004; Shrestha et al. 2014; Rodridues et al. 2004), сполуки з антимікотичним ефектом (Broberg et al. 2007), діацетил (Oberman et al. 1982), етанол, оцтовий альдегід (Klewicka and Libudzisz 2004).

Незважаючи на такий широкий спектр антагоністичних речовин у більшості випадків лактобактерії проявляють антагонізм завдяки продукції органічних кислот. Відомо, що більшість МКБ є продуцентами саме молочної кислоти (Trias et al. 2008; Гармашева та ін. 2015; Uraipan and Hongpattarakere 2015; Klewicka and Libudzisz 2004).

Бактеріоцини продукують широке коло бактерій, як з грампозитивною так і з грамнегативною клітинною стінкою (Zacharov and Lovitt 2012). Особливий інтерес дослідників серед антагоністичних сполук МКБ викликають бактеріоцини. Це термостабільні антимікробні сполуки білкової природи, що синтезуються на рибосомах і вважаються перспективними як для харчової промисловості в якості консервантів, так і для медицини як альтернатива традиційним антибіотикам. Бактеріоцини МКБ неповністю вивчені, оскільки в наукових публікаціях з'являються нові повідомлення про виділення бактеріоцинів, які ще не були описані (Perez et al. 2014). Крім того, цікаво, що бактеріоцини також виконують функцію забезпечення зв'язку між бактеріям у процесі утворення біоплівки (Gillor 2007).

Бактеріоцини не відносяться до антибіотиків та відрізняються від них за декількома ознаками. По-перше, бактеріоцини є первинними метаболітами оскільки синтезуються на рибосомах та по-друге, бактеріоцини мають більш вузький спектр активності (Zacharov and Lovitt 2012).

Крім перспективи бактеріоцинів як консервантів у харчовій промисловості та альтернативи антибіотикам їх вивчення заслуговує на увагу для розробки

пробіотиків. Відомо, що бактеріоцини надають бактеріям, що їх продукують, конкурентну перевагу, в тому числі й над патогенними мікроорганізмами. Бактерії таких штамів є перспективними для розробки пробіотиків для покращення здоров'я людини і тварин. Вони можуть представляти цінність навіть для аквакультур (Gillor et al. 2008). Крім того, бактеріоцини можуть бути перспективними для сільського господарства завдяки їх пригнічувальній активності та здатності покращувати ріст рослин (Subramanian and Smith 2015).

Згідно з даними літератури, бактеріоцини зберігають свою активність в широкому діапазоні рН і температур та руйнуються під дією протеолітичних ензимів. Ці особливості вказують на широкі перспективи застосування бактеріоцинів у різних сферах життєдіяльності людини. Так, бактеріоцин *Streptococcus thermophilus* T2 проявляє чутливість до таких ензимів, як протеїназа К, α -хімотрипсин, проназа Е, трипсин, зберігаючи свою активність після обробки каталазою та α -амілазою. Значення рН, при яких було описано збереження активності бактеріоцину *S. thermophilus* T2 коливалися від 4 до 8 (Mezaini et al. 2009), рН 4-9 та нагрівання при 80 °С навіть протягом години не елімінували активність ентероцину S37 (Belguesmia et al. 2010). Нагрівання при температурі 100 °С та рН від 2 до 10 не впливали на пригнічувальна активність ентероцину FN99 (Gupta et al. 2010). Ентероцин Р залишався активним при рН 2-11, після нагрівання при 100 °С протягом 60 хв та при 121 °С впродовж 15 хв (Cintas et al. 1997). Бактеріоцин Т8 витримував рН 4-10 та нагрівання при 100 °С протягом 60 хв (Kwaadsteniet et al. 2006).

Бактеріоцини лактобактерій в більшості випадків є активними саме проти бактерій з клітинною стінкою грампозитивного типу та можуть мати як широкий так і вузький спектр пригнічення бактеріального росту. Механізм антимікробної дії цих білкових речовин полягає у формуванні пор у цитоплазматичній мембрані завдяки проникненню бактеріоцина крізь неї всередину клітини, що призводить до зниження її стабільності та порушення енергетичного метаболізму клітини (Cintas et al. 2001). Відомо, що лантибіотик нізин зв'язується з ліпідом II, який є необхідним для синтезу клітинної стінки, що призводить до утворення пор в цитоплазматичній мембрані

(Breukink et al. 1999). Бактеріоцин під назвою нізин А може мати як бактерицидний так і бактериостатичний ефект. Бактеріоцидний ефект проявляється завдяки пороутворенню в цитоплазматичній мембрані, тоді як бактериостатичний реалізується шляхом зв'язування з ліпідом II (Okuda et al. 2013). Бактеріоцин лактоцин 160 спричиняє втрату АТФ та авторами зроблено припущення про те, що механізмом такого ефекту може бути пороутворення (Li et al. 2005). Пригнічувальна активність іншого бактеріоцину – лактоцину Q пояснюється утворенням великого розміру пор, що мають форму тороїда, через які із бактеріальних клітин виходять назовню навіть білки невеликого розміру (Yoneyama et al. 2009).

Для лактобактерій, що синтезують бактеріоцини відомо наявність так званих білків імунітету, що дозволяють уникнути їх антимікробної дії. Гени, білків імунітету входять в склад того ж оперону, що й гени бактеріоцину (Cintas et al. 2001).

Трикомпонентна сигнальна система контролює біосинтез багатьох бактеріоцинів лактобактерій. До складу цієї системи регулювання входять:

- 1) фактор індукції;
- 2) регулятор відповіді;
- 3) гістидин протеїн кіназа (Cintas et al. 2001).

Бактеріоцини загалом виділяються за допомогою АВС-транспортера або через загальний секреторний шлях (Cintas et al. 2001).

Для МКБ повідомлено здатність синтезувати різноманітні бактеріоцини та іноді навіть вони синтезують не один бактеріоцин, а від двох до трьох різних (Klaenhammer 1993; Nes et al. 1996).

Описано значну кількість бактеріоцинів МКБ і запропоновано різні системи їх класифікації. Вчений Кленхаммер вперше зробив спробу організувати в систему ці антимікробні сполуки лактобактерій та відніс до чотирьох окремих класів відомі на той час бактеріоцини цієї групи мікроорганізмів. Клас II бактеріоцинів лактобактерій було далі розділено на три підкласи - а, b та c іншими дослідниками (Klaenhammer 1993; Nes et al. 1996; Гармашева та Коваленко 2011; Alvarez-Sieiro et al. 2016).

Пізніше, бактеріоцини було згруповано у два класи: клас I, до якого входять

лантибіотики, та клас II, що включає не лантибіотики, тоді як бактеріоцини третього класу віднесено до бактеріолізінів. За цим виділили новий клас, до якого було віднесено бактеріоцини з кільцевою структурою (Cotter et al. 2005; Heng et al. 2007; Perez et al. 2014). Дійсно, в одній із останніх класифікаційних схем запропоновано розділити бактеріоцини не лише лактобактерій, а й всіх інших, що мають клітинну стінку грампозитивного типу на чотири групи:

- 1) лантибіотики;
- 2) пептиди, що не проходять модифікації та мають невеликий розмір;
- 3) білки великої молекулярної маси;
- 4) пептиди, що мають циклічну будову (Heng et al. 2007).

В одному з останніх оглядів було показано, що класифікація бактеріоцинів дотепер залишається суперечливою. Автори виділяють два класи бактеріоцинів, до першого з яких входять лантибіотики, а до другого – бактеріоцини без лантіоніну (Ness et al. 2014).

Однією з останніх схем класифікацій бактеріоцинів є система, згідно з якою бактеріоцини було розділено на три класи, що включають нові підкласи:

- 1) пептиди, що синтезуються на рибосомах та проходять посттрансляційну модифікацію;
- 2) бактеріоцини, що мають молекулярну масу менше 10 кДа та не проходять суттєвої посттрансляційної модифікації;
- 3) бактеріоцини великої молекулярної маси (Alvarez-Sieiro et al. 2016).

В одному з останніх оглядів серед лантибіотиків було виділено шість класів:

- 1) Ia – лантипептиди;
- 2) Ib – пептиди, циклізовані по типу “голова до хвоста”;
- 3) Ic – сактибіотики;
- 4) Id – лінійні пептиди, що містять азол (ін);
- 5) Ie – глікоцини,
- 6) If – ласопептиди (Alvarez-Sieiro et al. 2016).

Серед лантибіотиків найкраще дослідженим та широко відомим є бактеріоцин під назвою нізін А (Perez et al. 2014). Крім застосування нізину в якості

консерванта для харчової промисловості, було описано його перспективи для біомедицини (Shin et al. 2016). Крім нізину, до цього класу віднесено такі бактеріоцини МКБ, як ентероцин AS-48, глікоцин F (Alvarez-Sieiro et al. 2016).

Клас II включає невеликі за розміром молекули (<10 кДа). На відміну від лантибіотиків вони не проходять посттрансляційну модифікацію та у зв'язку з цим формування їх активних молекул забезпечується лише за рахунок декількох ферментів (білка-транспортера та лідерної пептидази) (Alvarez-Sieiro et al. 2016). До цього класу віднесено більшість відомих бактеріоцинів. Ці бактеріоцини синтезуються в неактивній формі, що має назву пребактеріоцин або пептид-прекурсор, до складу якого входить N-кінцевий лідерний пептид, що містить подвійний гліцин. Для отримання активної форми бактеріоцину лідерний пептид видаляється під час транспорту через ABC-транспортер (Cintas et al. 2001). Бактеріоцини класу II розділяються на чотири підкласи:

Па. педіоциноподібні бактеріоцини;

Пб. бактеріоцини, що складаються з двох пептидів;

Пс. безлідерні бактеріоцини;

Пд. однопептидні непедіоцинові бактеріоцини (Alvarez-Sieiro et al. 2016)

До відомих представників підкласу Па відносяться такі бактеріоцини як педіоцин PA-1, сакацин A (Alvarez-Sieiro et al. 2016).

До складу бактеріоцинів підкласу Пб входять декілька пептидів, що проявляють між собою синергічну дію. Цей підклас об'єднує такі бактеріоцини, як лактококцин G, плантарицини EF та JK, термофілін 13, ентероцин X (Nissen-Meyer et al. 2010; Alvarez-Sieiro et al. 2016).

До складу бактеріоцину лактококцину G, який продукується бактеріями штаму *L. lactis* LMG 2081, входять три пептиди, між якими спостерігається синергізм: $\alpha 1$ (4,346 Да), $\alpha 2$ та β (4,110 Да) (Nissen-Meyer et al. 1992).

Представники підкласу Пс є бактеріоцини, що не містять у своїй структурі лідерної послідовності. Серед представників цього підкласу відомі такі бактеріоцини, як ентероцин L50, лактіцин Q, бактеріоцин LsbB (Alvarez-Sieiro et al. 2016).

Підклас IId включає однопептидні непедіоцинові бактеріоцини, такі як лактококцин А, ентероцин В, лактококцин 972 (Alvarez-Sieiro et al. 2016).

До бактеріоцинів класу III відносяться білки, що не проходять модифікацію та мають велику молекулярну масу (>10 кДа), такі як зооцин, ентеролізін А, казеїн, гельветіцин J. Представники цього класу проявляють інгібувальну активність за допомогою двох способів: нелітичного або бактеріолітичного (Alvarez-Sieiro et al. 2016).

Що стосується бактеріоцинів, що продукуються ентерококами (ентероцинів), то вчені за допомогою результатів подібності їх послідовностей амінокислот організували їх у окрему систему (Franz et al. 2007). Згідно з нею, до першого класу входять бактеріоцини, що мають назву лантибіотикоподібні ентероцини, до яких належать цитолізін та ентероцин W (Franz et al. 2007; Sawa et al. 2012).

Цитолізін проявляє пригнічувальну активність проти клітин прокариот і здатний викликати лізис клітин еукаріот. До складу цього бактеріоцину входять дві субодиниці – CyLL та CyLS. Функцію активування цих субодиниць виконує серинова протеаза CyLA. Повідомлено також про те, що *E. faecalis* зі здатністю до утворення цитолізіну частіше виділяються з клінічних зразків (Booth et al. 1996).

Крім цитолізіну, до першого класу входить також ентероцин W. Цей бактеріоцин, який синтезується бактеріями штаму *E. faecalis* NKR-4-1, є схожим за своєю структурою до іншого бактеріоцину МКБ - плантарицину W та містить в своєму складі два компоненти ($W\alpha$ та $W\beta$), що проявляють синергізм (Sawa et al. 2012).

До II класу ентероцинів входять бактеріоцини-не лантибіотики. До підкласу II.1 відносять педіоциноподібні бактеріоцини, що містять в своєму складі амінокислотну послідовність під назвою педіоциновий бокс. Бактеріоцини під назвою ентероцин А і ентероцин Р входять до цього підкласу (Гармашева та Коваленко 2011; Franz et al. 2007). До складу ентероцину А входить 47 амінокислот та N-кінцева лідерна послідовність, що містить 18 амінокислот. Цей бактеріоцин продукують бактерії штаму *E. faecium* CTC492 (Aumerich et al. 1996).

Антимікробна сполука під назвою Ентероцин Р зберігає свою активність при

високих температурах, містить в своєму складі 44 амінокислоти та проявляє антимікробну активність проти ряду патогенних та псевдних бактерій (*Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*). Молекулярна маса цього бактеріоцину складає 4,493 Да та його продуцентами є бактерії штаму *E. faecium* P13. Описано також відкриту рамку зчитування, що відповідає за синтез білка імунітету, який має молекулярну масу 9,886 Да та містить 88 амінокислотних залишків (Cintas et al. 1997).

Крім вищеназваних ентероцинів, до підкласу II.1 входять також ентероцин CRL35, мундтіцини, бактеріоцини T8, 31, RC714, SE-K4 (Franz et al. 2007), авіцин А (Birri et al. 2010), бактеріоцин ST5Ha (Todorov et al. 2010).

Бактеріоцин під назвою ентероцин CRL35 має розмір 3,5 кДа, та здатний негативно впливати не лише на бактерії, а й на реплікацію вірусу герпеса. Продуцентом цього бактеріоцину є бактерії штаму *E. faecium* CRL35 (Wachsman et al. 1999).

Мундтіцин АТО6 має молекулярну масу 4,3 кДа та містить у складі 43 амінокислоти, продуцентом є бактерії штаму *Enterococcus mundtii* АТО6 (Bennik et al. 1998).

Інший ентероцин - мундтіцин KS - кодується генами плазміди. Для нього характерною є подібність до мундтіцину АТО6, як за послідовністю амінокислотних залишків так і за їх кількістю. Продуцентами цього бактеріоцину є бактерії *E. mundtii* NFRI 7393 (Kawamoto et al. 2002).

Ентероцин T8, який синтезується бактеріями штаму *E. faecium* T8, кодується генами плазміди, проявляє 69% та 47% подібності до бактеріоцину 31 та ентероцину Р, відповідно, та має вузький спектр дії. Молекулярна маса цього бактеріоцину складає 5,1 кДа (Kwaadsteniet et al. 2006).

Інший представник цього підкласу - бактеріоцин 31 - продукується бактеріями *E. faecalis* YI717, кодується геном, що знаходиться на кон'югативній плазміді та пригнічує ріст *E. faecium*, *E. hirae* та *L. monocytogenes* (Tomita et al. 1996).

Ентероцин RC714 синтезується бактеріями штаму *E. faecium* RC714 та має широкий спектр антимікробної активності проти грампозитивних бактерій.

Авторами повідомлено, що цей бактеріоцин є схожим на 92% з ентероцином 31 (Del Campo et al. 2001).

Ентероцин SE-K4 продукується бактеріями штаму *E. faecalis* K-4, які отримано з тайського силосу, та проявляє інгібувальну активність проти ентерококів, *L. monocytogenes*, *Clostridium beijerinckii* та *B. subtilis*. Ентероцин SE-K4 розміром 5,3 кДа є подібним за амінокислотою послідовністю до інших бактеріоцинів, що належать до підкласу IIa (Eguchi et al. 2001).

Авіцин А синтезується бактеріями *Enterococcus avium*, виділеними від дітей, є подібним до таких бактеріоцинів, як ентероцин CRL35 та мундтіцин KS, та пригнічує ріст бактерій виду *L. monocytogenes* (Birri et al. 2010).

Наступний представник цього підкласу - бактеріоцин ST5Ha - має молекулярну масу в розмірі 4,5 кДа. Цей бактеріоцин інгібує ріст *Listeria* sp. та МКБ. Більш того він має антивірусну активність. Продуцентами цього бактеріоцину є бактерії штаму *E. faecium* ST5Ha (Todorov et al. 2010).

Підклас II.2 включає ентероцини, що не містять лідерного пептиду – такі, як RJ-11, L50, MR10A, MR10B, EntC, Q, EJ97, X (Maldonado-Barragán et al. 2009; Franz et al. 2007; Hu et al. 2010).

Ентероцин RJ-11 характеризується здатністю пригнічувати бактерії з клітинною стінкою грампозитивного типу та молекулярною масою 5 кДа. Продуцентами цього бактеріоцину є бактерії штаму *E. faecalis* RJ-11, які було отримано з рисових висівок. Ентероцин RJ-11 є подібним до інших бактеріоцинів виду *E. faecium* (Yamamoto et al. 2003).

Ентероцин L50 зберігає свою активність при високих температурах, має молекулярну масу 5,250 Да та проявляє пригнічувальну активність проти *L. monocytogenes* та бактерій, що спричиняють псування їжі (Cintas et al. 1995). Цікаво, що цей бактеріоцин не продукується у випадку, коли температура інкубації *E. faecium* L50 складає 37 °C, а натомість – найбільший вихід цієї антимікробної сполуки відбувається при 16-25 °C (Cintas et al. 2000).

Бактеріоцини MR10A та MR10B мають молекулярні маси 5201 та 5207 Да, є подібними до інших бактеріоцинів, що входять до підкласу IIb - L50A та L50B.

Продукцентами ентероцинів MR10A та MR10B є бактерії штаму *E. faecalis* MRR 10-3, виділені з незвичайної екологічної ніші – з секрета залози удода (*Urupa erops*) (Martín-Platero et al. 2006).

Бактеріоцин - Ентероцин С (EntC) - представлений двома компонентами, між якими спостерігається синергізм, EntC1 та EntC2 з молекулярними масами 4284 та 3867 Да, відповідно (Maldonado-Barragán et al. 2009).

Ентероцин Q має молекулярну масу в розмірі 3,980 кДа, синтезується разом з ентероцином Р бактеріями штаму *E. faecium* L50. Він проявляє пригнічувальну активність проти таких бактерій як *L. sakei* 2714 та *E. faecium* P13 та відрізняється за своїм складом від відомих бактеріоцинів (Cintas et al. 2000).

Бактеріоцин під назвою ентероцин EJ97, що має молекулярну масу 5327 Да синтезується бактеріями штаму *E. faecalis* EJ97 (Sánchez-Hidalgo et al. 2003).

Інший бактеріоцин - ентероцин X - продукується бактеріями штаму *E. faecium* KU-B5. Два компоненти містяться в складі цього ентероцину – X α та X β , які мають молекулярні маси 4420,1 та 4068,5 Да, відповідно (Hu et al. 2010).

Клас П.3 містить лінійні бактеріоцини (96, 1071, В, 32), що мають у складі лідерний пептид (Franz et al. 2007; Izquierdo et al. 2009a).

Бактеріоцин 96 синтезується бактеріями штаму *E. faecalis* WHE 96, має молекулярну масу 5494 Да (Izquierdo et al. 2009a).

Бактеріоцин 1071 складається з двох компонентів, що мають назву ентероцини 1071А та 1071В, з молекулярними масами 4,285 та 3,899 кДа, відповідно, витримують вплив високих температур та є подібними до складових ще одного двопептидного бактеріоцину лактококцину G (Balla et al. 2000).

Встановлено, що ентероцин В є подібним до іншого бактеріоцину МКБ - карнобактеріоцину А. Цей бактеріоцин містить 53 амінокислотних залишки, проявляє антимікробну активність проти МКБ, стафілококів, лістерій (Casaus et al. 1997).

Бактеріоцин 32, за синтез якого відповідають плазмідні гени, виділено з бактерій *E. faecium* клінічного походження. Бактерії *L. monocytogenes* виявились стійкими до дії цього бактеріоцину, натомість він інгібував різні види ентерококів

(*Enterococcus hirae*, *Enterococcus durans* та *E. faecium*) (Inoue et al. 2006).

III клас ентероцинів (пептиди, що мають кільцеву структуру) охоплює ентероцин AS-48, ентероцин 4, ентерококцин EFS2, бактеріоцин 21 (Franz et al. 2007).

Ентероцин AS-48 має молекулярну масу 7,4 кДа та пригнічує ріст не лише грампозитивних бактерій, а й таких, що мають клітинну стінку грамнегативного типу (Gálvez et al. 1989).

Ентероцин 4 має молекулярну масу близько 7 кДа та однакову будову з ентероцином AS-48, проявляє антимікробну дію проти грампозитивних бактерій та цей ентероцин не пригнічує ріст бактерій з грамнегативною клітинною стінкою. Продуцентами цього бактеріоцину є бактерії штаму *E. faecalis* INIA 4 (Joosten et al. 1996).

Ентерококцин EFS2 з 67 амінокислот має молекулярну масу 7149,6 Да та синтезується бактеріями *E. faecalis* EFS2. Даний бактеріоцин проявляє інгібувальну активність проти лістерій та *S. aureus*, та його цікавою особливістю є те, що при температурі 15 °C його інгібувальний вплив не спостерігається (Maisnier-Patin et al. 1996).

Стосовно бактеріоцину 21, який продукується *E. faecalis*, відомо, що відповідальні за його синтез гени знаходяться кон'югативній плазміді rPD1 (Tomita et al. 1997).

IV клас ентероцинів містить чутливі до дії високих температур бактеріоцини з високою молекулярною масою, такі як ентеролізін А (Franz et al. 2007).

Ентеролізін А є білком з 316 амінокислот, що продукують бактерії штаму *E. faecalis* LMG2333. Він характеризується високою молекулярною масою порівняно з іншими ентероцинами (34,501 Да). Спектр активності цього бактеріоцину включає лактобацили, лактококи, ентерококи та педіококи (Nilsen et al. 2003).

В одному з останніх оглядів ентероцини віднесені до загальної класифікації бактеріоцинів, згідно з якою до першого класу (“лантибіотиків”) включені лише цитолізін та ентероцин W, тоді як до другого класу, який розділяється на підкласи - Па (“педіоциноподібні бактеріоцини”), Пв (“двопептидні бактеріоцини”), П

(“кільцеві бактеріоцини”), II (“безлідерні бактеріоцини”), II (“інші бактеріоцини”) - входить більшість ентероцинів. До підкласу Па дослідниками було віднесено ентероцин А, ентероцин Р, бактеріоцин 31, бактеріоцин GM1, мундтіцин KS, мундтіцин QU2, ентероцин CRL35, ентероцин SE-K4, ентероцин MC4-1, бактеріоцин T8, авіцин А, гірацин JM79, бактеріоцин RC714, дурацин GL та бактеріоцин 43. Наступні бактеріоцини було віднесено до підкласу Пв: ентероцин 1071 А, ентероцин 1071В, ентероцин С та ентероцин Х. Бактеріоцини AS48, ентероцин 4 та бактеріоцин 21 віднесено до підкласу II (“кільцеві бактеріоцини”), а MR10, ентероцин L50, ентероцин EJ97, ентероцин RJ-11 та ентероцин Q – до підкласу II (“безлідерні бактеріоцини”). До “інших бактеріоцинів” було віднесено бактеріоцин 32, бактеріоцин 51, ентероцин IT, ентероцин 96 та ентероцин В (Ness et al. 2014).

Отже, враховуючи усе вищенаведене, можна зробити висновок, що бактеріоцини МКБ є надзвичайно різноманітними, вони, в тому числі ентероцини, є досить добре охарактеризованими, що зумовлено перспективами їх широкого застосування. Незважаючи на це, бактеріоцини ентерококів, які є добре вивченими найчастіше відомі для видів *E. faecalis* та *E. faecium*, тоді як з інших видів ентерококів описано невелику їх кількість (Ness et al. 2014).

Здатність бактерій виду *Enterococcus italicus* до утворення бактеріоцинів показано лише в одній роботі, в якій *E. italicus* GGN10 з туніського молока синтезували два бактеріоцини: ентероцин А та ентероцин В (Gaaloul et al. 2014). Наявність лише одного повідомлення про виділення бактеріоцинів цим видом ентерококів говорить про недостатнє його вивчення.

1.3. Антагоністична активність молочнокислих бактерій щодо патогенних бактерій

З літературних джерел добре відомо про високу пригнічувальну активність бактерій різноманітних видів та штамів МКБ та їх бактеріоцинів проти патогенних і псувних бактерій. Так, було описано інгібувальну активність МКБ проти *Listeria innocua*, *S. aureus*, *Hafnia alvei*, (Ammor et al. 2006), *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* (Amel et al. 2015; Elayaraja et al. 2014), *L. monocytogenes* (Kim et al. 2015).

Було показано пригнічувальну активність бактерій штамів *L. plantarum* проти *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Salmonella enteritidis* (Arena et al. 2016). Ріст різних штамів грибів *Candida albicans* був пригнічений сполукою білкової природи ентерококів (Shekh and Roy 2012).

Антимікробну активність бактеріоцинів, в тому числі виділених з ентерококів, було показано проти *L. monocytogenes* (Mataragas et al. 2003; Izquierdo et al. 2009b), *E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus* (Joshi et al. 2006), *C. botulinum*, *C. perfringens* (Cintas et al. 1997), ентерококів, що мали стійкими до декількох антибіотиків (Hassan et al. 2015), *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella enterica*, *Citrobacter freundii*, *Shigella dysenteriae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *P. aeruginosa*, *Morganella morganii*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *Campylobacter jejuni* та *L. monocytogenes* (Line et al. 2008).

Серед усіх метаболітів МКБ саме бактеріоцини заслуговують особливої уваги завдяки високому потенціалу інгібувальної активності проти патогенних бактерій, які здатні викликати харчові токсикоінфекції. Можливим рішенням цієї проблеми є застосування МКБ з високими антагоністичними властивостями у харчовій промисловості для пригнічення росту патогенних та псувних бактерій (Wang and Liu 2016; Özogul and Named 2017).

Особливу проблему представляють патогенні та псувні мікроорганізми, здатні до утворення біоплівок, які можуть служити негативним фактором у харчовій промисловості та медицині (Mahdavi et al. 2007; Sadekuzzaman et al. 2015). Крім того, антимікробна активність відомих інгібувальних сполук є менш вираженою по відношенню до мікроорганізмів, що входять до складу біоплівки (Zhang et al. 2013). Відомо, що обробка бактеріоцинами МКБ може бути перспективним методом боротьби з мікроорганізмами біоплівок (Simões et al. 2011; Mahdavi et al. 2007).

Існує низка публікацій, які стосуються вивчення активності різних МКБ проти утворення біоплівок патогенними мікроорганізмами. Культуральні рідини бактерій видів *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus bulgaricus* та *Pediococcus pentosaceus* зменшували утворення біоплівок *S. aureus* (Вайпай et al. 2016; Ног and Liong 2014; Zmantar et al. 2016). Біоплівки *Staphylococcus epidermidis* також були

інгібованими МКБ (Tiwari et al. 2015). Нізин А був активним проти біоплівки *S. aureus* та інших стафілококів (Okuda et al. 2013; Mahdavi et al. 2007), проти біоплівки *Salmonella enteritidis* і *L. monocytogenes* (Mahdavi et al. 2007). Було показано зменшення біоплівкоутворення бактеріями виду *Escherichia coli* за допомогою культуральної рідини *Pediococcus pentosaceus* 4П1 (Bajrai et al. 2016). Розвиток біоплівки *P. aeruginosa* P7 на катеторі був зменшеним за допомогою бактеріоцину МКБ (Al-Mathkhury et al. 2011). Вчені вивчали бактеріоцини МКБ, який *in vitro* інгібував розвиток біоплівки *Streptococcus pneumoniae* та *S. aureus* (Wang and Liu 2016). Утворення біоплівки *Bacillus cereus* інгібував бактеріоцин *Lactobacillus acidophilus* (Salman et al. 2014). Формування біоплівки *L. monocytogenes* пригнічував бактеріоцин BGBU1-4 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* біовару *diacetylactis* (Cirkovic et al. 2016).

Не зважаючи на наявність інформації про пригнічення утворення біоплівок різноманітними МКБ та їх метаболітами, вплив бактеріоцинів бактерій виду *E. italicus* на утворення біоплівок залишається досі мало вивченим і потребує досліджень з теоретичної та практичної точки зору.

Крім патогенних та псувних бактерій окрему проблему представляють фітопатогенні мікроорганізми. Фітопатогени уражують сільськогосподарські рослини, що призводить до зменшення врожаїв та, відповідно, економічних збитків (Kazempour et al. 2010; Murthy et al. 2012).

В сільському господарстві для контролю над фітопатогенними мікроорганізмами використовують різноманітні агрохімікати, які незважаючи на свою ефективність можуть проявляти небажаний вплив на нормобіоту рослин. Заміною застосуванню пестицидів при вирощуванні рослин можуть бути МКБ, які є ефективними агентами біоконтролю навіть у польових умовах (Jiménez et al. 2015).

З наукових джерел відомо, що різні представники групи лактобактерій, в тому числі - лактобацили, ентерококи, лактококи, педіококи, леуконостоки та стрептококи належать до епіфітних бактерій (Li et al. 2015; Lin et al. 1992). Ймовірно завдяки цьому при внесенні їх у вигляді біопрепаратів на рослинні поверхні може спостерігатись їх виживання в польових умовах. Бактерії виду *L. plantarum* також

належать до таких, що населяють рослинні поверхні (Lin et al. 1992).

В багатьох публікаціях показано антагоністичну активність лактобактерій проти різноманітних фітопатогенів. Так, вітчизняними вченими показано, що штами *L. plantarum* пригнічували ріст фітопатогенної бактерії *R. radiobacter* C58 *in vitro* та *in vivo*. Цікаво, що вивчені три штами цього виду МКБ зменшували симптоми захворювання не в однаковій мірі (Limanska et al. 2014). Також показано, що усунення симптомів захворювання, що викликає *R. radiobacter* було досягнуто за допомогою додавання бактерій штаму *L. plantarum* ОНУ 87 разом з автолізатом штаму фітопатогенних бактерій *Erwinia carotovora* ZM1 (Korotaeva et al. 2013). У іншій роботі вітчизняних авторів лактобацили також інгібували *R. radiobacter* (Василюк та ін. 2014а).

Виявлено пригнічувальну активність МКБ, включаючи вид *L. plantarum*, проти фітопатогенних *E. carotovora*. При перевірці антибактеріальної активності *in vitro* показано, що п'ять штамів лактобацил видів *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. paracasei* та *L. rhamnosus* пригнічували ріст бактерій 12 штамів фітопатогену *E. carotovora*. Дія органічних кислоти була механізмом інгібувального впливу перевірених МКБ проти цього фітопатогену. При перевірці антагоністичної активності лактобацил *in vivo* на експлантах моркви показано надзвичайно високий рівень інгібування *E. carotovora*. Бактерії штамів *L. plantarum* ОНУ522, *L. plantarum* ОНУ523, *L. paracasei* ОНУ520 та *L. rhamnosus* ОНУ524 проявили 100% пригнічення симптомів, а *L. brevis* ОНУ521 – 85%. При використанні в якості моделі бульб картоплі лактобацили дещо в меншій мірі інгібували ріст фітопатогенів (Сергєєва та ін. 2016). В іншій роботі показано інгібування штамом МКБ *L. plantarum* ОНУ 87 фітопатогенної бактерії *E. carotovora* на різних моделях *in vivo* (Сергєєва та ін. 2012).

Вивчено антагоністичну активність двох штамів МКБ (штам *Lactococcus* sp. KLC02 та *Lactobacillus* sp. KLF01) проти штаму фітопатогенних бактерій *E. carotovora* subsp. *carotovorum*. Протестовані антагоністи проявили інгібувальну активність *in vitro* при перевірці методом агарових лунок. Цікаво, що при проведенні тепличних експериментів показано, що лактококи виявилися більш активними, ніж лактобацили. Встановлено пригнічення цього фітопатогену у польових умовах на

60% та 55% за допомогою штамів *Lactococcus* та *Lactobacillus*, відповідно (Shrestha et al. 2009). Антагоністичну активність лактобактерій проти цього виду фітопатогена показано також іншими авторами (Василюк та ін. 2014a; Trias et al. 2008; Mounesh et al. 2013; Visser et al. 1986).

У літературних джерелах зустрічаються також повідомлення про пригнічення лактобактеріями фітопатогену іншого виду – *Ralstonia solanacearum*. Дійсно, було встановлено антагоністичну активність двох штамів лактобактерій *L. paracasei* subsp. *tolerans* та *L. paracasei* subsp. *paracasei* проти цього небезпечного фітопатогену *in vitro*. В експериментах спостерігали утворення зон пригнічення росту ралстоній з радіусами 23-25 та 22-24 мм. Навіть у тепличних експериментах ці штами МКБ захищали рослини від фітопатогену (Murthy et al. 2012). Крім того, відомо про інгібування *R. solanacearum* за допомогою бактеріоцину МКБ. Так, бактеріоцин штаму ентерококів *Enterococcus durans* A5-11 було протестовано на наявність інгібувальної активності проти *R. solanacearum* за допомогою методів *in vitro*, що включали метод агарових шарів та культивування у бульйоні, та *in vivo* – на моделі коренів сіянців томатів. Дослідниками показано, що вивчений ентероцин проявив антибактеріальну активність проти 33% використаних штамів *R. solanacearum*. Інгібувальну активність дуранцину проти *R. solanacearum* було показано не лише *in vitro*, але й *in vivo* (Limanska et al. 2012).

У низці наукових робіт було показано також антагоністичну активність МКБ проти інших фітопатогенів. Так, у публікації вітчизняних вчених 109 штамів МКБ було перевірено на наявність пригнічувальної дії проти широкого спектру фітопатогенних бактерій та встановлено її наявність щодо *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas campestris*, *Clavibacter michiganensis*. Цікаво відмітити, що у цій роботі спостерігався зв'язок між походженням штамів МКБ цього виду та інтенсивністю їх інгібувального впливу, а також різна його вираженість по відношенню до індикаторів (Василюк та ін. 2014a). У наступній роботі такі мікроорганізми як *Botrytis cinerea*, *Monilinia laxa* та *X. campestris* були інгібованими лактобактеріями рослинного походження (Trias et al. 2008). Також показано антимікробну активність МКБ рослинного походження *in vitro* проти

фітопатогенів *X. campestris*, *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae*, *E. carotovora*, *P. syringae* та *P. syringae* var. *capsici*. Більшість ізолятів лактобактерій (37 із 43) виявились активними по відношенню до цих фітопатогенів, і крім того, мали широкий спектр активності (Visser and Holzapfel 1992). Про інгібування фітопатогенів ізолятами виду *L. plantarum* повідомлено у роботі, в якій МКБ проявили високий рівень пригнічувальної активності. Як *in vitro*, при тестуванні в рідкій культурі, так і *in vivo* при зараженні квасолі спостерігалася висока антагоністична активність досліджених МКБ проти фітопатогену *P. syringae*. Так, симптоми захворювання було зменшено за рахунок нанесення бактерій ізоляту *L. plantarum* L292 на листя рослин квасолі (Visser et al. 1986). Органічні кислоти, а саме молочна і оцтова, виступали в якості переважаючих чинників, що зумовлювали пригнічення росту фітопатогенів. Крім того, вченими було встановлено, що серед них кращою активністю володіла оцтова кислота (Visser and Holzapfel 1992).

Відомо про інгібування бактеріями штаму *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* небезпечного фітопатогена *Xanthomonas albilineans* (Serna-Cock et al. 2013). Лактобактерії ефективно пригнічували такі фітопатогени як *Pseudomonas savastanoi* та *Pantoea agglomerans* (Fhoula et al. 2013).

В експериментах *in vitro* та *in vivo* на моделі перцю, як в тепличних так і польових експериментах, лактобактерії інгібували фітопатогенну бактерію *X. campestris* pv. *vesicatoria* - збудника бактеріальної плямистості, захворювання перцю. При перевірці антагонізму авторами показано, що МКБ утворювали зони інгібування росту цього фітопатогену з діаметром більше 10 мм протягом 12 та 24 годин, що свідчить про виражений антагонізм. При проведенні тепличних експериментів, обробка штамами лактобактерій KLF01 та KLC02 зменшувала симптоми захворювання на листі рослин на 73,9% та 57%. Високу ефективність застосування лактобацил було також показано в польових експериментах (Shrestha et al. 2014).

Фітопатоген *Xanthomonas campestris* пригнічувався також лактобактеріями рослинного походження (Jalali et al. 2012) та з молока корів (Kannan et al. 2014).

Крім збудників захворювань бактеріальної природи МКБ здатні також проявляти антагоністичну активність проти фітопатогенних грибів. Так, було

показано пригнічення лактобактеріями таких фітопатогенів, як *Pythium ultimum* (Lutz et al. 2012), *B. cynerea*, *M. laxa* (Trias et al. 2008).

Незважаючи на те, що антагоністичні властивості окремих штамів бактерій виду *L. plantarum* проти фітопатогенних бактерій є досить добре вивченими, у літературних джерелах недостатньо інформації про вплив на фітопатогени комплексів бактерій різних штамів лактобацил. Не зустрічається також інформації про вплив на фітопатогенні бактерії сумішей бактерій видів *E. italicus* та *L. plantarum*, як і ентерококів та лактобацил взагалі.

Інформація про антимікробну активність ентерококів та їх бактеріоцинів проти фітопатогенів зустрічається рідко. Крім того, дослідження інгібувальної активності *E. italicus* та їх продуктів метаболізму проти фітопатогенних бактерій до цього часу не проводилось, і такі дані є повністю відсутніми у літературі.

1.4. Застосування молочнокислих бактерій

На теперішній час, область застосування лактобактерій та їх метаболітів є надзвичайно широкою та включає такі сфери життєдіяльності людини як харчова індустрія, сільське господарство, медицина та ветеринарія (Василюк та ін. 2014а). Такий широкий спектр практичного застосування зумовлений комбінацією цінних властивостей МКБ, таких як непатогенність (мають GRAS статус - Generally Recognized As Safe) та виражені антагоністичні властивості проти патогенних та псувних мікроорганізмів (Wessels et al. 2004; Nikita and Hemangi 2012; Kim et al. 2015; Ammor et al. 2006).

Завдяки своїй здатності інгібувати ріст патогенних та псувних мікроорганізмів МКБ можуть бути використаними для біозахисту продуктів харчування (Aguilar and Klotz 2010).

Лактобактерії широко використовуються у харчовій промисловості в якості заквасок для хлібопечення, для консервування овочів, таких як огірки, капуста, томати, що забезпечує їх зберігання. Отримання м'ясних продуктів, напоїв, соленої риби потребує участі МКБ (Квасников і Нестеренко 1975). *L. plantarum* відомі також застосуванням для виготовлення продуктів харчування з пробіотичними

властивостями (Sabo et al. 2014).

Не меншу цікавість для використання у харчовій промисловості привертають ентерококи. Ферментація деяких продуктів харчування проходить за участю цих мікроорганізмів (Franz et al. 2011). Показано перспективність бактерій *E. italicus* для виготовлення продуктів харчування (Gaaloul et al. 2014).

МКБ мають перспективи застосування у сільському господарстві завдяки здатності захищати рослини від фітопатогенів та стимулювати ріст рослин (Higa and Kinjo 1989; Kang et al. 2015; Shrestha et al. 2014; Murthy et al. 2012; Abdel-Aziz et al. 2014; Zhunko et al. 2017; <https://rooftopecology.wordpress.com/2009/09/29/korean-natural-farming-lactic-acid-bacteria-lab/>).

У медицині та ветеринарії лактобацили та ентерококи застосовуються як пробіотичні препарати. До пробіотичних ентерококів відносяться певні штами види *Enterococcus faecalis* та *Enterococcus faecium* (Franz et al. 2011). Види *L. plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus fermentum* відносяться до пробіотичних МКБ роду *Lactobacillus* (Gayathri et al. 2011; Єлинська та ін. 2003). Про перспективи застосування бактерій виду *L. plantarum* в якості пробіотиків було повідомлено в роботі вітчизняних вчених (Vasulyk et al. 2014).

Аналізуючи данні літератури можна зробити висновок, що незважаючи на широке вивчення різних представників групи МКБ та їх антимікробних сполук, бактерії виду *E. italicus* все ще залишаються недостатньо охарактеризованими. В літературі рідко зустрічається інформація про біохімічний склад бактерій цього виду та про бактеріоцини, що ними продукуються. Крім того, в наукових публікаціях є повністю відсутньою інформація про вплив бактерій *E. italicus* на фітопатогенні мікроорганізми та про здатність ентерококів цього виду до утворення біоплівки на поверхнях рослин.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Експериментальну частину роботи виконано на кафедрі мікробіології, вірусології та біотехнології, Біотехнологічному науково-навчальному центрі Одеського національного університету імені І.І. Мечникова та лабораторії "Біополімери-взаємодія-комплексування" Національного інституту сільськогосподарських досліджень (Biopolymers-Interactions-Assemblages, INRA) м. Нант, Франція. В роботі використовували мікробіологічні, біохімічні та молекулярно-біологічні методи.

2.1. Досліджувані штами мікроорганізмів

Для пошуку продуцентів бактеріоцинів та вивчення антагоністичної активності до патогенних та псевдних бактерій нами було виділено та досліджено штами МКБ зі зразків ферментованих продуктів рослинного і тваринного походження, відібраних на ринках України і Таїланду. Крім того, для виконання роботи також використовували штами лактобацил з колекції кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології ОНУ, які також були ізольовані нами з рослинного матеріалу України та ідентифіковані при проведенні попередніх робіт, штами *L. plantarum* з виноградного сусла України, штами *L. plantarum*, виділені з рослинного матеріалу Франції, та штами *L. plantarum* B2694 і B2709 з колекції Інституту мікробіології і вірусології НАНУ.

В роботі використано також штами бактерій-індикаторів: *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 (Японська колекція мікроорганізмів), *Escherichia coli* CIP 76.24, *Brochothrix thermosphacta* DSMZ 20171, *Pediococcus pentosaceus* DMST 18752, *Listeria innocua* CIP 80.11 (ONIRIS), *Listeria ivanovii* subsp. *ivanovii* 20750 (DSMZ - Німецька колекція мікроорганізмів та клітинних культур Лейбніцького інституту), *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Відділ клінічної мікробіології університету Умео, Швеція), *Rhizobium radiobacter* C58, *Erwinia carotovora* ZM1, *Ralstonia solanacearum* УКМ В-1109, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 8511 та *P. syringae* pv. *atrofaciens* D13 (Колекція Інституту мікробіології та вірусології ім.

Заболотного, Київ), *Rhizobium vitis* UA6 (Колекція кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології ОНУ імені І.І. Мечникова) та *Rhizobium rhizogenes* 15834 (Колекція мікроорганізмів Санкт-Петербурзького аграрного університету).

Нові ізоляти МКБ виділяли із проб ферментованих рослинних продуктів (капуста, яблука, томати, кавуни, огірки, оливки та маслини), молодого вина, молочних продуктів, ковбаси домашнього виготовлення, морепродуктів (мідії, ферментована та солена риба, рибний соус), відібраних в Україні (Одеська область, місто Одеса, ринок Привоз) і Таїланді (Південний Таїланд, провінція Сонгкхла, ринок міста Хатъяй) (табл. 2.1.1).

Таблиця 2.1.1

Джерела виділення молочнокислих бактерій

Кількість проб	Назва продукту	Рік виділення	Країна
25	квашені яблука, молоде вино, квашені кавуни, квашені томати, квашена капуста та квашені огірки	2013-2014	Україна
7	квашена капуста та квашені томати	2015	Україна
22	квашена капуста, рибний соус, ферментована риба	2015	Таїланд
60	солена риба, ферментовані риба, мідії, ковбаса, оливки, маслини, квашені капуста, томати, огірки, бринза, мацун	2016	Україна

Виділення МКБ здійснено шляхом посіву на 1,5% агаризоване середовище de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) за методом штриха. Після двох днів інкубації при 30-37 °С, подібні за морфологією до МКБ колонії, відбирали та пересівали.

Для первинної ідентифікації МКБ проводили каталазний тест з 3% перекисом водню та забарвлення за Грамом. Всі каталазо-негативні ізоляти консервували в гліцеринових стоках з 30% гліцерину та поміщали на зберігання при -20 °С.

2.2. Вивчення генетичного різноманіття ізолятів МКБ на основі профілів RAPD-ПЛР

Для вивчення генетичного різноманіття ізолятів проводили RAPD-ПЛР з праймером M13. До складу реакційної суміші входили один мкл праймера M13 (10 пмоль), 2 мкл динуклеозидтрифосфатів (4 ммоль кожного, SibEnzyme, Росія), 0,8 мкл Mg^{2+} (50 ммоль, AmpliSens, Росія), 0,4 мкл Taq-полімерази (5 Од/мкл, Primatech, Білорусія), ПЛР буфер (10x, SibEnzyme, Росія). Виділення ДНК з досліджуваних ізолятів лактобактерій здійснювали з використанням набору "ДНК-Сорб" (Інститут Епідеміології, Росія). Ампліфікацію проводили на термоциклері "MyCycler" (BioRad, США) у наступні етапи: початкова денатурація при 94 °C - 3 хв; 35 циклів: денатурація 94 °C - 1 хв, відпал праймеру 45 °C - 1 хв та елонгація 72 °C - 2 хв; фінальна елонгація при 72 °C - 5 хв (Ben Omar et al. 2008). Продукти ПЛР аналізували шляхом електрофорезу в агарозному гелі (1% агарози, TAE буфер). Розмір ампліконів вимірювали з використанням програми GelAnalyzer 2010. Філогенетичне дерево будували за допомогою програми Matlab 7.0 з використанням кластерного аналізу на основі кореляції Спірмена та методу Варда.

2.3. Скринінг на продукцію бактеріоцинів

Скринінг ізолятів МКБ на продукцію бактеріоцинів проводили методом агарових лунок. Бактерії *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 було використано в якості індикаторного мікроорганізму, оскільки встановлено, що вони проявляють високу чутливість до бактеріоцинів МКБ (Hwahlen et al. 2014; H-Kittikun et al. 2015). Перед використанням в експерименті штами МКБ, які зберігалися в гліцеринових стоках при -20 °C, було двічі активовано. Для активації штами МКБ культивували у бульйоні MRS при 30 °C протягом 17 годин. Нічні культури центрифугували при 10000 g, 10 хв, відбирали НОР, рН якої нейтралізували за допомогою 1M NaOH. Стерилізація здійснювалась шляхом прогрівання при 100 °C на водяній бані протягом 10 хв. (Schillinger and Lücke 1989; Hwanhlem et al. 2014). Для приготування газонів індикатора до попередньо розплавленого 0,8% агару MRS додавали 0,1% добової культури *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157. В отриманому агарі вирізали лунки,

в кожному з яких вносили 50 мкл НОР. Бактерії культивували при 30 °С протягом ночі та обстежували на наявність чітких зон інгібування росту (Schillinger and Lücke 1989; Hwanhlem et al. 2015).

Для підтвердження білкової природи антагоністичних речовин було використано протеїназу К (Thermo Scientific, США), яку додавали до кінцевої концентрації 1 мг/мл, рН 7,8 встановлювали за допомогою 1М NaOH для оптимального значення рН ензиму та інкубували впродовж трьох годин при 37 °С. У якості контролю використано НОР без обробки протеїназою та розчин ензиму в бульйоні MRS. Після цього активність подвійно розведеної у фосфатному буфері НОР перевіряли проти *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 методом агарових лунок. Рівень активності (ВО/мл) визначали за наступною формулою:

$$\text{ВО/мл} = (1000/V) \cdot D, \quad (1)$$

(V - об'єм НОР, який вносили в лунки та D – останнє розведення, що спричиняло пригнічувальну активність) (Saeed et al. 2004; Hwanhlem et al. 2014).

2.4. Вивчення властивостей та ідентифікація штаму-продуцента бактеріоцину

Ідентифікацію бактерій штама продуцента бактеріоцину проводили за тинкторіальними, морфологічними, культуральними, фізіолого-біохімічними властивостями, а також послідовністю нуклеотидів фрагмента гену 16S рРНК.

Морфологію клітин вивчали за допомогою світлової та електронної мікроскопії. Для проведення світлової мікроскопії клітини забарвлювали за Грамом за стандартною методикою. Мікроскопію проводили за допомогою мікроскопу ZeissPrimoStar зі збільшенням x1000, фотографували камерою Ахіосам 105 color та розмір клітин встановлювали за допомогою програми ZEN 2 lite (CarlZeiss, Оберкохен, Німеччина).

З метою приготування препаратів для проведення електронної мікроскопії бактеріальні клітини наносили на сітки з міді та нітроцелюлозною плівкою на поверхні впродовж години, промивали протягом 10 хв дистиллятом, забарвлювали 2% ураніл ацетатом (30-40 сек) і фіксували за допомогою 96% етилового спирту (Тихоненко, 1968). Мікроскопію було виконано за допомогою електронного

мікроскопа JEOLJEM 1400 (Акасіма, Токіо, Японія) зі збільшенням 15-30 тис. разів.

Культуральні властивості бактерій визначали за допомогою стандартних методів, а фізіолого-біохімічні - системи API 50 CH (Analytical Profile Index) (Biomérieux, Франція) відповідно до інструкції виробника.

2.4.1. Визначення вмісту амінокислот

Для визначення спектру амінокислот, що входять до складу клітин бактерій штаму *E. italicus* ОНУ547, їх вирощували на агаризованому середовищі MRS при 37 °С впродовж 24 год. Отриману біомасу змішували з двома мл 6Н НСІ та гідролітично розщеплювали протягом 24 год при температурі 110 °С. Отриманий гідролізований матеріал в об'ємі 0,5 мл центрифугували та надосадову рідину концентрували за допомогою роторного випаровувача. У процесі концентрування матеріал було позбавлено вмісту НСІ шляхом промивання дистиллятом (три рази). Отриманий осад розчиняли в дистиляті (0,5 мл) та фільтрували за допомогою целюлозних фільтрів (0,2 мкм). Для дослідження амінокислотного складу використовували ВЕРХ та перед аналізом амінокислоти дериватизували за допомогою о-фталевого альдегіду та 9-флуореніл метоксикарбоніл хлориду. Для проведення хроматографії використовували прилад Agilent 1200 (AgilentTechnologies, Санта-Клара, США) з колонкою ZorbaxAAA з параметрами: 4,6 м, 150 мм, 3 мкм, в якій амінокислоти розділяли за допомогою буферів А та В (1,5 мл/хв.). У якості буферу А було використано 40 мМ розчин Na_2HPO_4 , тоді як до складу буферу В входив ацетонітрил, вода та метанол (Jámbor and Molnár-Perl 2009).

2.4.2. Вивчення складу цукрів бактерій штаму *E. italicus* ОНУ547

Для отримання біомаси бактерії *E. italicus* ОНУ547 культивували на MRSагарі протягом 24 год за температури 37 °С. Потім, отримували суміш вирощених клітин з 2 М трифтороцтовою кислотою та виконували гідроліз (6 год, 100 °С). Після цього, проводили концентрування та промивку суміші. Гідроксиламін солянокислий в метанолі (0,3 мл) використовували для дериватизації виділених цукрів (75 °С, 25 хв). Екстрагування моносахаридів проводили дихлоретаном в

об'ємі 1 мл, після чого до його висушеної фракції доливали 300 мкл реактиву, що складався з етилацетату та гептану у пропорції 1:1. Для аналізу складу цукрів використовували хромато-мас-спектрометрію з гелієм як рухомою фазою (1,2 мл/хв), виконану на приладі Agilent 6890N/5973inert обладнаному колонкою HP-5ms з наступними параметрами: довжина 30м, внутрішній діаметр 0,25мм, товщина нерухомої фази 0,25мкм (AgilentTechnologies, Санта-Клара, США) (Guerrant and Moss, 1984).

2.4.3. Аналіз складу органічних кислот

Бактерії *E. italicus* ОНУ547 культивували в 20 мл MRS бульйону при температурі 37 °С впродовж 48 год. Дводобові культури центрифугували (4000g, за 4 °С, 15 хв) та відбирали надосадову рідину, рН якої понижали за допомогоюНСІ. Газову хромато-мас-спектрометрію, як і у випадку аналізу складу цукрів, проводили за допомогою обладнання Agilent 6890N/5973inert, але з використанням іншої колонки (DB-FFAP з параметрами: довжина - 30м, внутрішній діаметр - 0,25мм, товщина нерухомої фази - 0,25 мкм) (AgilentTechnologies,Санта-Клара, США). Гелій, який рухався зі швидкістю 1 мл/хв використовували у якості мобільної фази.

2.4.4. Визначення спектру жирних кислот

Ідентифікацію штама продуцента бактеріоцину проводили шляхом визначення спектру жирних кислот на газовому хроматографі «BioRad», за стандартною методикою (Raineu and Oren 2011) з використанням автоматичної системи ідентифікації мікроорганізмів MIDI Sherlock на базі газового хроматографа з полум'яно-іонізаційним детектором Agilent 7890 (Agilent Technologies, США), колонка капілярна 25м×0,2мм×0,33мкм Ultra 2, швидкість потоку 3 мл/хв, газ-носії водень, градієнт температури від 150 °С до 300 °С впродовж 6 хв (http://www.midi-inc.com/pdf/Sherlock_MIS_Operating_Manual.pdf).

Підготовку проб здійснювали згідно з інструкцією виробника. Спочатку, з метою здійснення омилення, до біомаси добової культури бактерій додавали 1 мл реагенту №1, перемішували на вортексі впродовж 5-10 сек і прогрівали при 100 °С впродовж 5 хв. Потім, знову перемішували на вортексі, прогрівали при 100 °С

впродовж 25 хв і охолоджували. Для здійснення метилування додавали 2 мл реагенту №2, перемішували на вортексі впродовж 5-10 сек, прогрівали на водяній бані при 80 °С впродовж 10 хв і швидко охолоджували. Наступним етапом було екстрагування жирних кислот шляхом додавання 1,25 мл реагенту №3 та перемішування впродовж 10 хв, після чого суміш розділялась на дві фракції. До відібраної верхньої фракції, з метою здійснення промивання, додавали 3 мл реагенту №4, перемішували впродовж 5 хв і відбирали верхню фракцію, яка містила виділені жирні кислоти (http://www.midi-inc.com/pdf/Sherlock_MIS_Operating_Manual.pdf).

Склад реагентів для виділення жирних кислот:

Реагент №1 – NaOH (45 г), метанол (150 мл), дейонізована дистильована вода (150 мл);

Реагент №2 – 6N HCl (325 мл), метанол (275 мл);

Реагент №3 – гексан (200 мл), метил-трет-бутиловий етер (200 мл);

Реагент №4 – NaOH (10,8 г), дейонізована дистильована вода (900 мл) (http://www.midi-inc.com/pdf/Sherlock_MIS_Operating_Manual.pdf).

Газову хроматографію виконували за допомогою хроматографа Agilent 7890, який оснащений колонкою Ultra 2 з 5% фенілметилсилоксану (25 м x 0,2 мм) (Agilent Technologies, Санта-Клара, Каліфорнія, США). В якості рухомої фази використовували водень (http://www.midi-inc.com/pdf/Sherlock_MIS_Operating_Manual.pdf).

2.4.5. Визначення чутливості до антибіотиків

Визначення чутливості до антибіотиків бактерій штаму *E. italicus* ОНУ547 здійснювали з використанням набору АТВTM ENTEROC 5 (Biomérieux, Франція) згідно з інструкцією виробника.

2.4.6. Сиквенування гену 16S рРНК

Для проведення сиквенування гену 16S рРНК добову культуру вирощували при 37 °С у бульйоні MRS. ДНК виділяли з бактеріальних клітин за допомогою набору Omega Bio-tek (США) згідно з протоколом виробника. Суміш для проведення

полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) містила наступні компоненти: праймер fD1(10 μ M), праймер rD1 (10 μ M) (Weisburg et al. 1991), ДНК (20 ng/ μ l), BIOAmp Master mix (1x). ПЛР було проведено в ампліфікаторі Techne Touchgene Gradient (Кембридж, Великобританія). Параметри ампліфікації були наступними: початкова денатурація при 95 °C – 2 хв; надалі 40 циклів з денатурацією при 95 °C – 30 сек, відпалом праймерів при 45 °C – 30 сек, елонгацією при 72 °C – 30 сек; крок фінальної елонгації при 72 °C – 7 хв (Weisburg et al. 1991). Продукти ПЛР розділяли шляхом електрофорезу в 1% агарозному гелі. Секвенування проводили за методом Сенгера в GATC Biotech (Німеччина) та nucleotide BLAST застосовували для вирівнювання послідовності з іншими з Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) (Gaaloul et al. 2014).

Філогенетичне дерево було побудовано в програмі MEGA6 за допомогою методу Neighbor-Joining з використанням двохпараметричного методу Кімури (Tamura et al. 2013; Kimura 1980; Saitou and Nei 1987; Felsenstein 1985).

2.5. Визначення антимікробного спектру бактеріоцина

НОР бактерій продуцентів бактеріоцину готували, як описано раніше, та перевіряли проти індикаторних штамів: *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* 20750, *L. innocua* CIP 80.11, *E. coli* CIP 76.24, *B. thermosphacta* DSMZ 20171, *P. pentosaceus* DMST 18752, *P. aeruginosa* PAO1, *R. radiobacter* C58, *R. vitis* UA6, *R. rhizogenes* 15834, *E. carotovora* ZM1, *R. solanacearum* УКМ В-1109, *P. syringae* pv. *syringae* 8511, *P. syringae* pv. *atropaciens* D13.

Активність НОР тестували методом агарових лунок, як описано раніше. Для приготування газонів середовище ВНІ (Biokar Diagnostics, Франція) та середовище NB (HiMedia, Індія) з 0,8% агар-агару засівали добовими культурами використаних індикаторів. Температура інкубації для *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* 20750, *L. innocua* CIP 80.11, *E. coli* CIP 76.24, *P. pentosaceus* DMST 18752 становила 30 °C, для *P. aeruginosa* PAO1 – 37 °C, для *B. thermosphacta* DSMZ 20171 – 25 °C, та для фітопатогенних бактерій – 28 °C.

2.6. Виділення та очищення бактеріоцину

Бактерії штаму-продуцента *Enterococcus italicus* ОНУ547 культивували протягом доби при 30 °С в 400 мл бульйону MRS. Після цього, НОР отримували шляхом центрифугування (10 000 g, 15 хв), після чого її рН доводили до 7,0 за допомогою 4М NaOH. Активність НОР тестували методом агарових лунок, як було описано раніше з використанням в якості індикатору *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 (H-Kittikun et al. 2015).

Бактеріоцин з супернатанту осаджували за допомогою 70% сульфату амонію протягом доби при +4 °С. Фракцію преципітованого бактріоцини отримували за допомогою центрифугування з подальшим розчиненням осаду в дейонізованій воді та зберігали при -20 °С. Активність визначали методом агарових лунок проти *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 (H-Kittikun et al. 2015).

Для очищення бактеріоцину *E. italicus* ОНУ547 використано декілька методів. Перша група методів полягала у чотирьохетапній процедурі очищення і включала преципітацію сульфатом амонію, іонообмінну хроматографію, гідрофобну хроматографію та обернено-фазову високоефективну рідинну хроматографію (ОФ-ВЕРХ). Друга група методів полягала у гідрофобній хроматографії та іонообмінній хроматографії з системою АКТА Explorer.

Для проведення іонообмінної хроматографії розчин осаду після преципітації сульфатом амонію розводили у 10 разів буфером А та вносили до картриджів Ser-Pak Vac 12 cc (2г) Accell Plus CM (Waters, США) для катіонообмінної хроматографії та Ser-Pak Vac 12 cc (2г) Accell Plus QMA (Waters, США) для аніонообмінної хроматографії. Промивали двічі буферами А та В та здійснювали елюцію буфером С. Концентратор Speed-Vac (Savant) використовували для випаровування ацетонітрилу з отриманих фракцій. рН проб доводили до нейтрального значення за допомогою 1М NaOH. Активність бактеріоцину перевіряли як описано вище (Hwanhlem et al. 2013).

Склад буферів для проведення іонообмінної хроматографії:

Буфер А - 5 мМ KH_2PO_4 , рН 2,8;

Буфер В - 5 мМ KH_2PO_4 , 0,4 М КСl, рН 2,8;

Буфер С - 5 мМ KH_2PO_4 , 0,4 М КСl, 30% ацетонітрилу, рН 2,8.

Активну фракцію після катіонообмінної хроматографії розводили у п'ять разів за допомогою води MilliQ та вносили до картриджу Sep-Pak Vak C₈ (Waters, США) для виконання гідروفобної хроматографії. Етап промивання проводили за допомогою 0,2% трифтороцтової кислоти, елюцію здійснювали 100% ацетонітрилом. Ацетонітрил з відібраних фракцій випаровували, а потім визначали активність бактеріоцину проти *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 (H-Kittikun et al. 2015).

Після цього, активні фракції після іонообмінної та гідروفобної хроматографії вносили до системи ОФ-ВЕРХ (Milford, США) з колонкою C₈ (Symmetry C₈, 3,5 μm, Ірландія) та очистку виконували методом градієнтної елюції. Для еквілібрації використовували буфер А, а для елюції – буфер В. Фракції відбирали вручну, ацетонітрил випаровували та активність перевіряли проти індикатору *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157, як було описано раніше (Hwanhlem et al. 2013).

Склад буферів для проведення ОФ-ВЕРХ :

Буфер А - 98% води MilliQ, 2% ацетонітрилу, 0,05% трифтороцтової кислоти;

Буфер В - 20% води MilliQ, 80% ацетонітрилу, 0,04% трифтороцтової кислоти.

У другій групі методів бактеріоцинів очищали за допомогою гідروفобної хроматографії з картриджем C₈ та іонообмінної хроматографії з використанням системи АКТА Explorer (GE Healthcare, США). Для цього 400 мл добової культури *E. italicus* ОНУ547, вирощеної в бульйоні MRS при 37 °С, центрифугували при 8000 g протягом 15 хв. НОР відділяли від осаду та змішували з ацетонітрилом для отримання 25% кінцевої концентрації ацетонітрилу. Картриджі (C₈, 5 г) активували 100% ацетонітрилом та еквілібрували 25% розчином ацетонітрилу в воді MilliQ. Після цього 135 мл суміші вносили до картриджів, та промивали 25% ацетонітрилом в воді MilliQ. Елюцію виконували 100% ацетонітрилом. Фракції відбирали та ацетонітрил випаровували, як було описано раніше. рН проб доводили до нейтрального значення додаванням 1/3 об'єму натрієвого фосфатного буферу (10 мМ, рН 6,4). Після цього фракції елюції гідروفобної хроматографії використовували для виконання іонообмінної хроматографії з колонкою HiPrep[®] QXL (Pharmacia Biotech, 20 мл, США) з системою АКТА Explorer. Активні фракції аніонообмінної колонки пропускали крізь картридж C₈ для додаткового етапу очищення. рН проб

нейтралізували і визначали активність проти *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157.

2.7. Вплив температури на активність бактеріоцину

Чутливість бактеріоцину *E. italicus* ОНУ547 до різних температур визначали шляхом термальної обробки НОР при 80 °С протягом 15 та 30 хв, 100 °С - 15 хв та при автоклавуванні (121 °С) протягом 15 хв. Частково очищений бактеріоцин (ЧОБ) прогрівали при 80 °С протягом 15 та 30 хв. Готували двократні серійні розведення оброблених проб в 0,2 М калієвому фосфатному буфері, і тестували їх активність проти індикатору *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 як описано вище. Активність прогрітих проб порівнювали з активністю необроблених НОР та ЧОБ (H-Kittikun et al. 2015).

2.8. Визначення молекулярної маси бактеріоцину

Молекулярну масу бактеріоцину визначали за допомогою електрофорезу білків у поліакриламідному гелі в присутності трицину і додецилсульфату натрію (трицин-ДСН-ПААГ). В дослідженні проаналізовано НОР і ЧОБ *E. italicus* ОНУ547. 40 мкл буферу (Zymogram Sample Buffer, BIO-RAD, США) додавали до проб в об'ємі 40 мкл, 20 мкл вносили до лунок та електрофорез проводили при 40 мА, 10 °С. В якості контролю використовували нізін. Для визначення молекулярної маси використовували маркер (SIGMA-ALDRICH, США) з діапазоном молекулярних мас (2500 – 17000 Да). Буфери для проведення білкового електрофорезу мали наступний склад: катодний буфер - 0,1 М трис, 0,1 М трицин, 0,1% ДСН, рН 8,1, анодний буфер - 0,2 М трис, рН 8,9. Фіксацію проводили розчином, що містив 30% ізопропанолу та 10% оцтової кислоти впродовж однієї год та промивку виконували за допомогою води MilliQ двічі протягом 15 хв. Кумасі блакитний використовували для забарвлення одного гелю протягом однієї години та залишали для промивання від надлишків барвника протягом доби. Другий гель заливали розплавленим агаром MRS (1%), що містив 0,1% добової культури індикатору *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 та інкубацію проводили при 37 °С. Після цього, відмічали наявність зон пригнічення росту (Schägger and von Jagow 1987; Sahingil et al. 2011; H-Kittikun et al. 2015).

2.9. Вплив бактеріоцину на утворення біоплівки та планктонні клітини

Для вивчення впливу на утворення біоплівки та планктонні клітини використовували НОР, концентрований бактеріоцин та ЧОБ, активність яких тестували мікротитраційним методом у планшетах. Індикаторними штамми були *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157, *P. aeruginosa* PAO1 та *R. radiobacter* C58. Для дослідження 20 мкл бактеріоцину вносили в лунки 48-лункового планшета, в які також додавали один мл бульйонів MRS (для *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157) та NB (для *P. aeruginosa* PAO1 та *R. radiobacter* C58). Потім в лунки планшетів додавали 50 мкл добових культур бактерій-індикаторів. Планшети інкубували при 37 °C (*L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 та *P. aeruginosa* PAO1) та 28 °C (*R. radiobacter* C58) протягом доби. У контролі до штамів-індикаторів бактеріоцин не додавали. Наступного дня, планктон відділяли в інший планшет та вимірювали оптичну щільність (ОЩ) при 600 нм за допомогою планшетного рідера (BioTek, США). Біоплівки фіксували 96% етанолом протягом 15 хв та забарвлювали 1% кристалічним фіолетовим протягом 10 хв, після чого промивали водою з водогону. Після висихання у кожен лунку додавали лізуючий розчин (0,1 М NaOH, 1% ДСН) і планшети залишали у темряві на 1,5 год для руйнування біоплівки. ОЩ лізованих біоплівки вимірювали при 592 нм (Christensen et al. 1985).

Дослідження проводили у трьох незалежних експериментах з шістьма повторами в кожному. Статистичний аналіз, що включав підрахунок середнього арифметичного, помилки середнього арифметичного та t-тест, було виконано за допомогою програми Microsoft Office Excel. Результати вважали статистично достовірними при $p < 0,05$.

Для підтвердження бактеріоцинової природи інгібувального ефекту на утворення біоплівки *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 до проби бактеріоцину додавали протеїназу К, як описано раніше. Після інкубації ензим дезактивували шляхом нагрівання при 80 °C протягом 15 хв. У якості контролів використовували розчин протеїнази К та концентрований бактеріоцин без ензиму, прогріті також при 80 °C протягом 15 хв. Фіксацію, забарвлення та облік результатів проводили, як описано раніше.

2.10. Вивчення антимікробної активності бактерій *E. italicus* ОНУ547 та їх сумішей з *L. plantarum* до фітопатогенних бактерій *in vivo*

Визначення антагоністичної активності лактобактерій проти фітопатогенів *in vivo* проводили на експлантах моркви (*Daucus carota* L.). Коренеплоди відмивали від залишків ґрунту за допомогою миючого засобу, обробляли 1% розчином дезінфектанту "Білизна", після чого ретельно промивали під проточною водою. У стерильних умовах знімали верхній шар коренеплоду, фламбували за допомогою 96% етилового спирту, нарізали для отримання дисків-експлантів (Ryderet al. 1985). Експланти клали апікальною стороною догори у вологі чашки Петрі з шаром фільтрувального паперу на дні, змоченого 10 мл стерильної води з водогону.

В експериментах було використано добові культури МКБ у концентрації 10^8 кл/мл. З добових культур готували суміші бактерій *E. italicus* ОНУ547 та бактерій *L. plantarum* у співвідношенні 1:1. По 100 мкл бактеріальних культур отриманих сумішей наносили на поверхню експлантів моркви в зоні розміщення камбіального кільця та після цього додавали 100 мкл добових культур *R. radiobacter* C58 або *E. carotovora*ZM1. Як контролю використовували експланти, на які наносили фітопатогенні бактерії разом з бульйоном MRS і фітопатогенні бактерії без додавання середовища. Інкубацію здійснювали за кімнатної температури протягом 15-30 днів. Після цього експланти моркви візуально обстежували на наявність пухлин та гнилей, оцінювали відсоток ураження експланту гниллю (у випадку *E. carotovora*) або появу пухлин на камбіальному кільці (у випадку *R. radiobacter*). Відсоток інгібування фітопатогенів лактобактеріями оцінювали згідно з таблицею 2.10.1.

Таблиця 2.10.1

Показники оцінки ураження експлантів моркви фітопатогенами

Кількість уражених гниллю та пухлинами експлантів, %	Відсоток інгібування фітопатогена лактобактеріями
0%	100%
33%	67%
67%	33%
100%	0%

Експерименти виконували у 3-х повторях.

2.11. Визначення здатності МКБ до утворення біоплівки на поверхнях рослин

Здатність до утворення біоплівки на поверхнях рослин вивчали на моделі крес-салату (*Lepidium sativum* L.). Для цього насіння рослин стерилізували за допомогою 25% перекису водню протягом однієї хвилини і три рази промивали у стерильній воді з водогону. Насіння пророщували у стерильній вологій камері впродовж трьох днів. Суспензії добових культур МКБ доводили водою до концентрації 10^8 кл/мл, готували суміші бактерій, як описано вище, та вносили у лунки планшету в об'ємі 1,5 мл. Потім у кожен лунку поміщали проросток крес-салату. Інкубацію здійснювали при 37 °C впродовж доби. На другий день біоплівки, утворені на поверхнях рослин, фіксували за допомогою 96% етанолу протягом 15 хв. Після цього забарвлення здійснювали протягом 10 хв акридиновим помаранчевим (1%). Після цього проростки викладали на предметні скельця та після висихання корінці обстежували на наявність біоплівки за допомогою мікроскопа Primo Star PC, Carl Zeiss (Оберкохен, Німеччина) зі збільшенням $\times 320$. Експерименти були виконані у п'яти повторях та система плюсів була використана для встановлення ступеню сформованості біоплівки, як описано у роботі (Галкін та ін. 2012).

Експерименти проводили у трьох повторях. Статистичну обробку (середнє значення, стандартне відхилення, помилка середнього арифметичного) та побудову графіків виконували за допомогою програми Microsoft Office Excel.

РОЗДІЛ 3

БАКТЕРІОЦИНОГЕННА АКТИВНІСТЬ ІЗОЛЯТІВ МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ

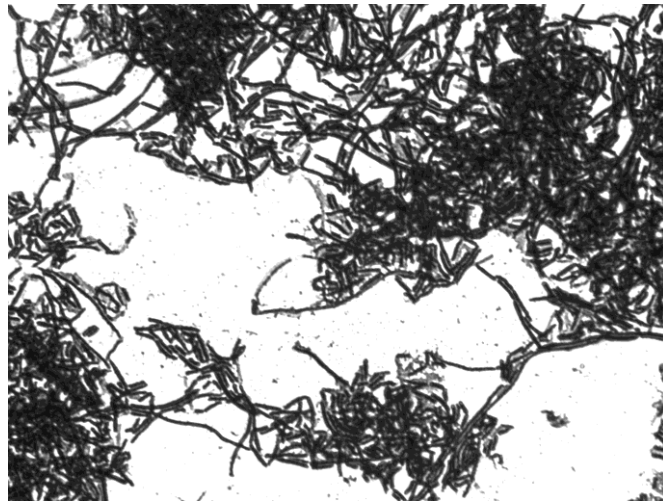
3.1. Вивчення ізолятів молочнокислих бактерій з різних географічних зон

Експериментальну частину цієї роботи було розпочато з виділення нових ізолятів МКБ зі зразків ферментованих продуктів рослинного і тваринного походження, відібраних на ринках України і Таїланду. Необхідно відмітити, що більшість з цих продуктів пройшли процес природної ферментації і можуть використовуватись у харчовій промисловості в якості стартових культур (Mourad et al. 2004; Azat et al. 2016). Належність МКБ до мікроорганізмів з GRAS статусом дозволяє розглядати ці мікроорганізми абсолютно безпечними для здоров'я людини і тварин (Zacharof and Levittb 2012).

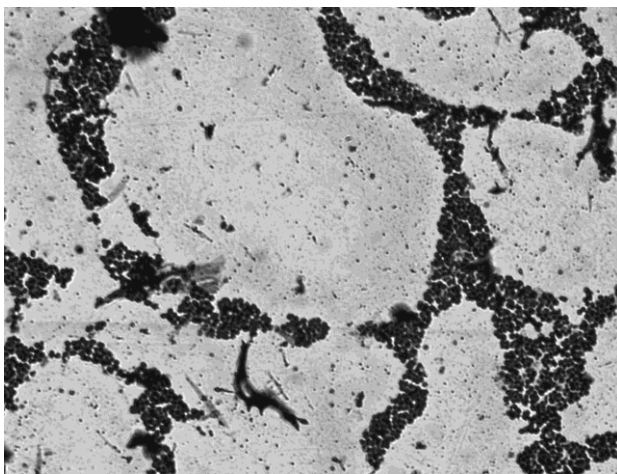
Особливої уваги заслуговують штами ентерококів, які здатні утворювати бактеріоцини та ферментувати харчові продукти вважаються придатними джерелами для їх отримання (Ness et al. 2014).

У результаті висіву зразків ферментованих продуктів на середовище MRS було відібрано ізоляти бактерій, які за фенотиповими ознаками відповідали представникам МКБ (Nikita and Nemangi 2012). Із рибного соусу і ферментованої риби Таїланду виділити МКБ не вдалося.

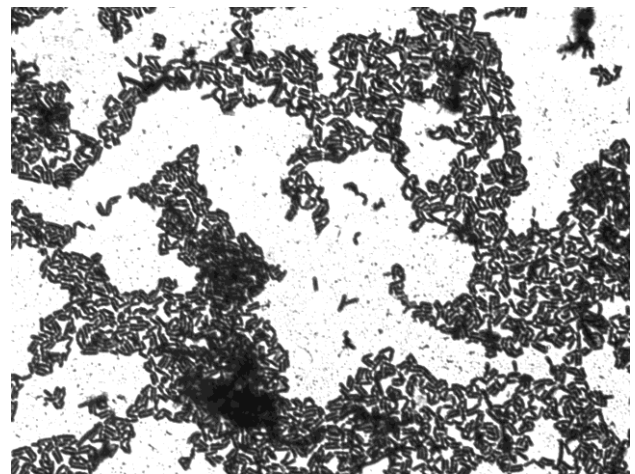
Бактерії отриманих ізолятів МКБ показували позитивну реакцію при забарвленні за Грамом з різноманітною морфологією клітин (рис. 3.1.1). За морфологією серед них були короткі та довгі палички, розміщені окремо і в ланцюжках та коки.



1



2



3

Рис. 3.1.1. Молочнокислі бактерій, виділені з продуктів домашнього виробництва

Примітки: 1 - ізолят Od1 з квашених огірків України, 2 - ізолят W з квашеної капусти Таїланду, 3 – ізолят 06 з квашеної капусти Таїланду. (світловий мікроскоп, x1000)

Показано, що серед загальної кількості лактобацил, виділених під час проведення попередніх досліджень ізоляти *L. plantarum* зустрічались у кількості 58,3% у суслі з ягід винограду України та 38,2% у суслі винограду Франції (Ліманська та ін. 2016). Вивчення генетичної різноманітності 25 штамів *L. plantarum*, ізольованих з сусла з ягід винограду відібраного на насадженнях України, за результатами аналізу профілів RAPD-ПЛР з праймером M13 показало, що вони

поділяються на чотири кластери (рис. 3.1.2) (Merlich et al. 2013).

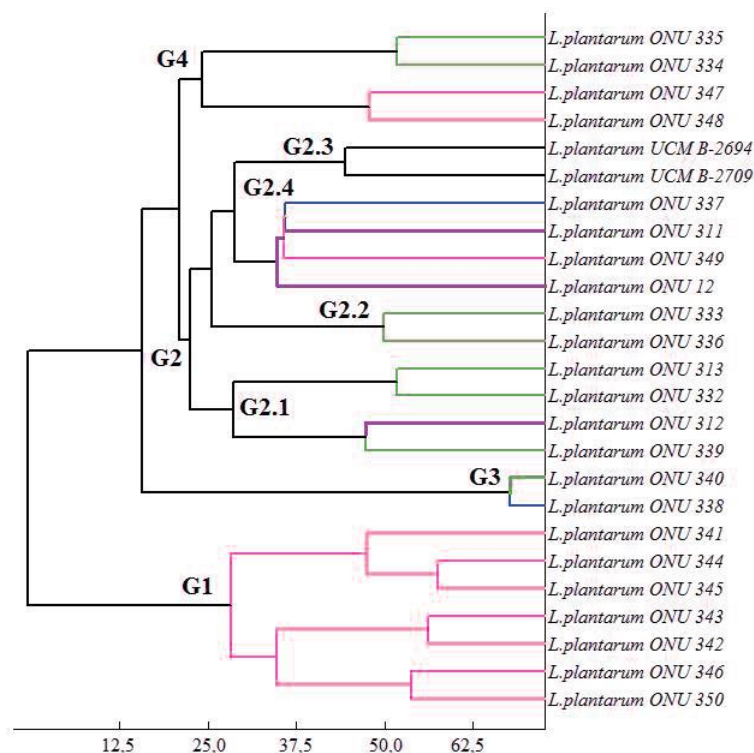


Рис. 3.1.2. Дендрограма спорідненості штамів *L. plantarum*, визначена за допомогою RAPD-ПЛР

- | | |
|-------------------|------------------------------|
| — Сорт Лідія; | — Сорт Кардинал; |
| — Сорт Піно нуар; | — Сорт Дністровський рожевий |

На основі аналізу результатів RAPD-ПЛР можна зробити висновок, що у більшості випадків генетична подібність ізолятів *L. plantarum* не пов'язана з регіоном походженням або джерелом виділення.

3.2. Скринінг штамів МКБ на продукцію бактеріоцинів

Отримані зі зразків ферментованих продуктів ізоляти МКБ були вивчені на здатність до продукції бактеріоцинів методом агарових лунок з використанням індикатора бактерій *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157. Серед них виявлено штам, який виділено з тайської ферментованої капусти, що проявив антагоністичну активність добової культури проти *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 з нейтралізованим рН.

Наявність інгібувальної активності було встановлено за прозорою зоною відсутності бактеріального росту навколо лунки з внесеною надосадовою рідиною (НОР) (Мерліч та ін. 2017b).

Виходячи з того, що на активність НОР не впливала нейтралізація і кип'ятіння, зроблено припущення, що антимікробні речовини цього штаму ймовірно відносяться до бактеріоцинів. Щоб підтвердити це припущення проведено обробку НОР протеолітичним ензимом протеїназою К та повторне визначення активності проти *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157. Показано, що перед обробкою протеїназою К активність НОР складала 320 ВО/мл, а після обробки протеолітичним ферментом антимікробна активність зникла повністю, що вказує на білкову природу антимікробних продуктів метаболізму досліджуваного штаму МКБ, оскільки за біохімічною природою бактеріоцини є протеїнами і втрачають свою активність після обробки протеолітичним ензимом (Aumerich et al. 1996; Floriano et al. 1998; Balla et al. 2000; Yamamoto et al. 2003; Dezwaan et al. 2007; Mezaini et al. 2009; Belguesmia et al. 2010; Gupta et al. 2010; Perez et al. 2014).

Втрата інгібувальної активності антимікробної сполуки після обробки протеїназою К дозволила зробити висновок про те, що даний ізолят МКБ продукує бактеріоцин (Мерліч та ін. 2017b).

3.3. Ідентифікація та характеристика штама-продуцента бактеріоцину

Ідентифікацію ізольованого штаму бактерій, здатних до продукції бактеріоцину, було проведено за допомогою комплексу тинкторіальних, морфологічних, культуральних, фізіолого-біохімічних ознак, складу жирних кислот та секвенування гену 16S рРНК. Комбінація таких ознак як позитивна реакція за Грамом і негативна каталазна реакція ще на етапі виділення ізолятів дозволила нам віднести ці бактерії до порядку *Lactobacillales* групи МКБ (de Vos et al. 2009). Морфологію клітин та їх розмір встановлено за допомогою світлової та електронної мікроскопії. Форма клітин цих бактерій овальна, розміри варіюють від 480 до 830 нм, розміщуються попарно та в коротких ланцюжках (рис. 3.3.1 та 3.3.2).

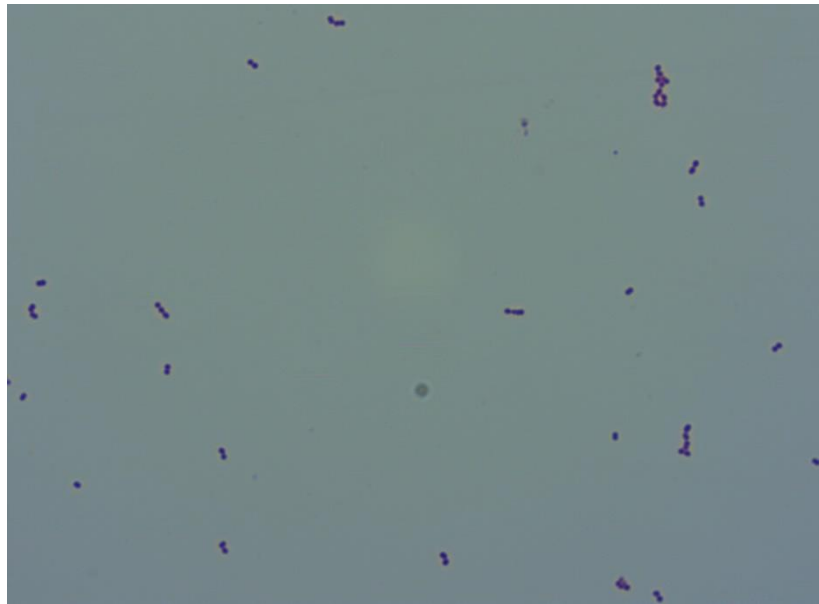


Рис. 3.3.1. Клітини бактерій штама продуцента бактеріоцину
(світловий мікроскоп, x1000)

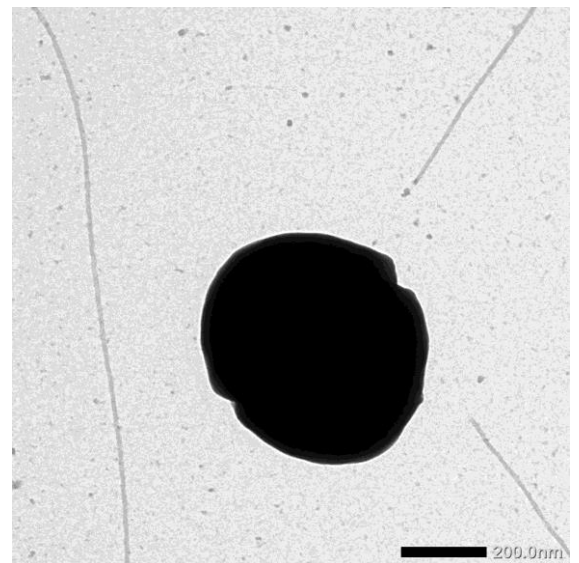
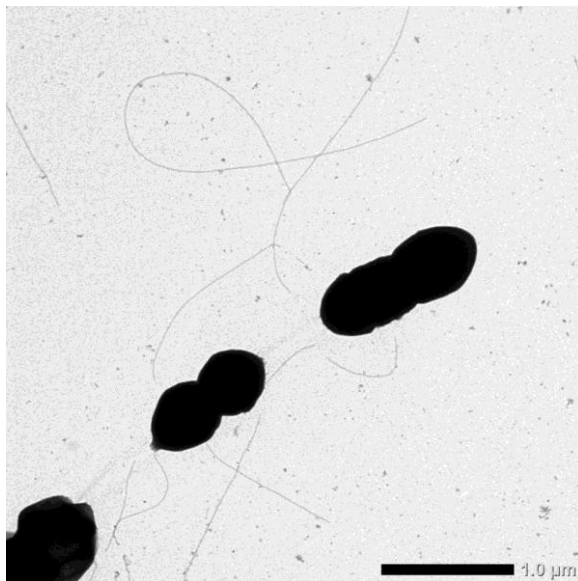


Рис. 3.3.2. Електронні фотографії клітин бактерій ізольованого штаму
продуцента бактеріоцину

Морфологічні та тинкторіальні ознаки дозволили припустити належність виділеного штаму продуцента бактеріоцину до родини *Enterococcaceae*, роду *Enterococcus* (de Vos et al. 2009). На агаризованому середовищі MRS ці бактерії утворюють блискучі колонії округлої форми діаметром один міліметр, мають гладку

поверхню, випуклий профіль та брудно-білий (білувато-сірий) колір. Пігмент не утворюють. Після доби культивування у MRS бульйоні ростуть у вигляді рівномірного помутніння середовища з утворенням невеликого осаду. Концентрація клітин після доби інкубування при 37 °C сягала 10⁸ кл/мл. На підставі культуральних та фізіолого-біохімічних властивостей виділений штам можливо віднести до видів *Enterococcus ratti*, *Enterococcus italicus*, *Enterococcus camelliae* або *Enterococcus hermanniensis* (таблиця 3.3.1.) відповідно до de Vos et al. 2009.

Виявлені ознаки бактерій, такі як розмір клітин, колір колоній та їх морфологія, нездатність до утворення пігменту, ріст при рН 9, відсутність росту в присутності 6,5% NaCl і при 4 °C є характерними для штамів виду *E. italicus* (Vancanneyt et al. 2004; Fortina et al. 2004; Gaaloul et al. 2014). Нездатність бактерій-продуцентів бактеріоцину до росту при 45 °C відрізняє їх від бактерій видів *E. ratti* та *E. camelliae*. Відсутність росту в присутності 6,5% NaCl відрізняє їх додатково від *E. ratti*. Нездатність виділених нами продуцентів бактеріоцину утилізувати рибозу і здатність утилізувати цукрозу відрізняє їх від *E. ratti*, нездатність утворювати кислоти із целобіози – від *E. camelliae*, а нездатність до утилізації рибози, арбутину, целобіози і здатність утворювати кислоти з цукрози – від *E. hermanniensis*.

Таблиця 3.3.1

Порівняльна характеристика фізіолого-біохімічних властивостей бактерій штаму *E. italicus* ОНУ547 та представників видів ентерококів

Ознака	<i>E. italicus</i> ОНУ547	<i>E. italicus</i> (Fortina et al. 2004)	<i>E. ratti</i> (Teixeira et al. 2001)	<i>E. camelliae</i> (Sukontasing et al. 2007)	<i>E. hermanniensis</i> (Koort et al. 2004)
1	2	3	4	5	6
Ріст при 4 °C	-	a	a	a	a
Ріст при 30 °C	+	a	a	a	a
Ріст при 37 °C	+	+	a	a	+

Продовж. табл. 3.3.1

1	2	3	4	5	6
Ріст при 45 °С	-	d	+	+	-
Ріст в присутності 5% NaCl	-	+	a	a	a
Ріст в присутності 6,5% NaCl	-	-	+	-	d
Ріст в присутності 10% NaCl	-	a	a	-	-
Ріст при рН 3	-	a	a	a	a
Ріст при рН 6	+	a	a	a	a
Ріст при рН 9	+	a	a	+	a
Утилізація гліцеролу	-	-	-	-	-
Утилізація еритрітолу	-	-	a	-	-
Утилізація D-арабінози	-	-	a	-	d
Утилізація L-арабінози	-	-	-	-	-
Утилізація D-рибози	-	-	+	-	+
Утилізація D-ксилози	-	-	-	-	-
Утилізація L-ксилози	-	-	a	-	-
Утилізація D-адонітолу	-	-	a	-	-
Утилізація метил βD-ксилопіранозиду	-	-	a	-	-

Продовж. табл. 3.3.1

1	2	3	4	5	6
Утилізація D-галактози	-	+	a	-	d
Утилізація D-глюкози	+	+	a	+	+
Утилізація D-фруктози	+	+	a	+	+
Утилізація D-манози	+	+	a	+	+
Утилізація L-сорбози	-	-	-	a	-
Утилізація L-рамнози	-	-	a	-	d
Утилізація дульсітола	-	-	a	-	-
Утилізація інозитола	-	-	a	-	-
Утилізація D-манітола	+	d	d	+	+
Утилізація D-сорбітола	-	d	-	-	-
Утилізація метил- α D-манопіранозиду	-	-	a	-	a
Утилізація метил- α D-глюкопіранозиду	-	+	-	-	a
Утилізація N-ацетилглюкозаміну	+	+	a	+	+
Утилізація амідгаліну	-	-	a	-	d
Утилізація арбутину	-	d	a	-	+

Продовж. табл. 3.3.1

1	2	3	4	5	6
Утилізація ескуліну, цитрату заліза	+	+	a	+	a
Утилізація саліцину	-	+	a	+	+
Утилізація D-целобіози	-	w	a	+	+
Утилізація D-мальтози	+	+	+	+	+
Утилізація D-лактози	-	+	d	-	-
Утилізація D-мелібіози	-	-	-	-	-
Утилізація D-цукрози	+	+	-	+	-
Утилізація D-трегалози	+	+	d	+	w
Утилізація інуліну	-	-	-	-	-
Утилізація D-мелезітози	-	-	a	-	-
Утилізація D-рафінози	-	-	-	-	-
Утилізація амідону	-	+	a	-	-
Утилізація глікогену	-	-	a	-	-
Утилізація ксилітолу	-	-	a	-	-
Утилізація гентібіози	-	d	a	-	w
Утилізація D-туранози	-	-	a	-	-

Продовж. табл. 3.3.1

1	2	3	4	5	6
Утилізація D-ліксози	-	-	a	-	-
Утилізація D-тагатози	-	d	a	-	-
Утилізація D-фукози	-	-	a	-	-
Утилізація L-фукози	-	-	a	-	-
Утилізація D-арабітолу	-	-	a	-	w
Утилізація L-арабітолу	-	-	a	-	-
Утилізація глюконату калія	-	-	a	-	-
Утилізація 2-кетоглюконату	-	-	a	-	-
Утилізація 5-кетоглюконату	-	-	a	-	-

Примітка: + – реакція позитивна; - – реакція негативна; d – реакція варіабельна; w – реакція слабка; a – дані відсутні.

Здатність бактерій штаму *E. italicus* ОНУ547 використовувати як джерело енергії мальтозу, трегалозу, цукрозу, D-фруктозу, D-глюкозу, D-манозу, N-ацетилглюкозамін, ескулін в нашому дослідженні відповідає результатам, отриманим Fortina et al. (2004). Здатність утворювати кислоти з гентібіози, манітолу, арбутину, сорбітолу та тагатози може залежати від штаму бактерій цього виду (Fortina et al. 2004). До штамоспецифічних ознак належить також утилізація метил- α -D-глюкопіранозиду, целобіози, манітолу, амігдаліну, трегалози, саліцину, тагатози та туранози (Vancanneyt et al. 2004).

Відсутність здатності бактерій *E. italicus* до утилізації рибози, еритритолу,

ксилози, метил- β D-ксилопіранозиду, сорбози, метил- α D-манопіранозиду, глюконату, інуліну, мелібіози, мелезітози, рафінози, 2-кетоглюконату, арабінози, арабітолу, 5-кетоглюконату, адонітолу, гліцеролу, дульситолу, рамнози, інозитолу, рибози, амідгаліну, глікогену, ксилітолу, туранози, фукози та ліксози узгоджується з результатами Fortina et al. 2004. Нездатність *E. italicus* до кислотоутворення при утилізації арбутину, гентібіози та рибози відрізняє його від більшості інших видів ентерококів (Vancanneyt et al. 2004).

Інформація про амінокислотний склад цих бактерій цього виду відсутня. Визначення нами спектру амінокислот, що входять до складу клітин бактерій штаму *E. italicus* ОНУ547, показало, що за своєю кількістю переважають L-аргінін, гліцин та L-глутамінова кислота з відсотковим складом 16,58%, 16,47% та 12,68%, відповідно (таблиця 3.3.2, рис. 3.3.3).

Таблиця 3.3.2

Амінокислотний склад клітин бактерій штаму *E. italicus* ОНУ547

Час утримання (хв)	Амінокислота	Частка (%)
1	2	3
1,62	L-аспаргінова кислота	3,29
2,68	L-глутамінова кислота	12,68
6,23	L-серин	3,94
7,45	L-гістидин	4,15
7,75	гліцин	16,47
7,99	L-треонін	1,51
9,07	L-аргінін	16,58
9,46	L-аланін	4,81
10,96	L-тирозин	3,65
13,08	L-валін	4,10
13,35	L-метіонін	2,45
14,79	L-ізолейцин	7,28
15,00	L-фенілаланін	3,73

1	2	3
15,75	L-лейцин	9,80
16,42	L-лізин	-
20,62	L-пролін	5,56

Інші амінокислоти присутні в меншій кількості: L-лейцин (9,80%), L-ізолейцин (7,28%), L-пролін (5,56%), L-аланін (4,81%), L-гістидин (4,15%), L-валін (4,10%), L-серин (3,94%), L-фенілаланін (3,73%), L-тирозин (3,65%), L-аспаргінова кислота (3,29%), L-метіонін (2,45%) та L-треонін (1,51%). Виявлено, що до складу бактеріальних клітин *E. italicus* ОНУ547 не входить L-лізин. Наскільки нам відомо, це перше повідомлення про амінокислотний спектр МКБ виду *E. italicus*. Лише відомо, що до складу пептидоглікану бактерій *E. faecium* входять такі амінокислоти як аспарагін, аланін, лізин, а також глютамін (Billot-Klein et al. 1996).

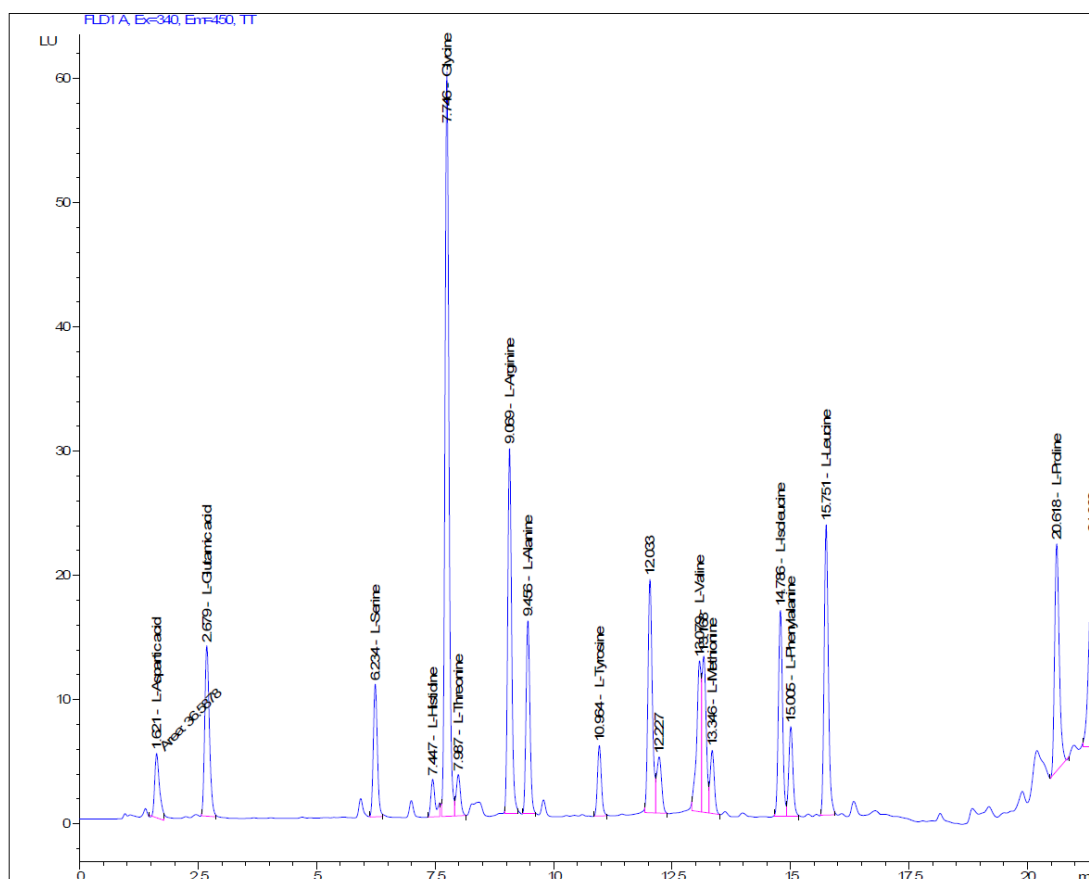


Рис. 3.3.3. Результати амінокислотного аналізу бактерій штаму *E. italicus* ОНУ547

Проаналізовано склад цукрів, які входять до складу бактерій штаму *E. italicus* ОНУ547 (таблиця 3.3.3, рис. 3.3.4).

Таблиця 3.3.3

Склад цукрів, що входять до складу клітин бактерій штаму *E. italicus* ОНУ547

Час утримання (хв)	Цукор	Частка %
5,22	Рамноза	1,09
5,57	Арабіноза	3,38
5,90	Ксилоза	1,20
12,08	Маноза	1,29
12,51	Глюкоза	87,77
12,97	Галактоза	5,27

Серед ідентифікованих цукрів у найбільшій кількості присутня глюкоза, яка складає 87,77% від загальної кількості. Ймовірно, виявлена глюкоза в значній мірі входить до складу глюкозаміна та мурамової кислоти, які були детектовані при вивченні складу пептидоглікану клітинної стінки ентерококів (Billot-Klein et al. 1996).

Вперше для бактерій *E. italicus* визначено, що крім глюкози до складу клітин *E. italicus* ОНУ547 входять також інші цукри, але в значно меншій кількості. Дійсно, серед ідентифікованих цукрів трапляється галактоза (5,27%), арабіноза (3,38%), маноза (1,29%), ксилоза (1,20%) та рамноза (1,09%).

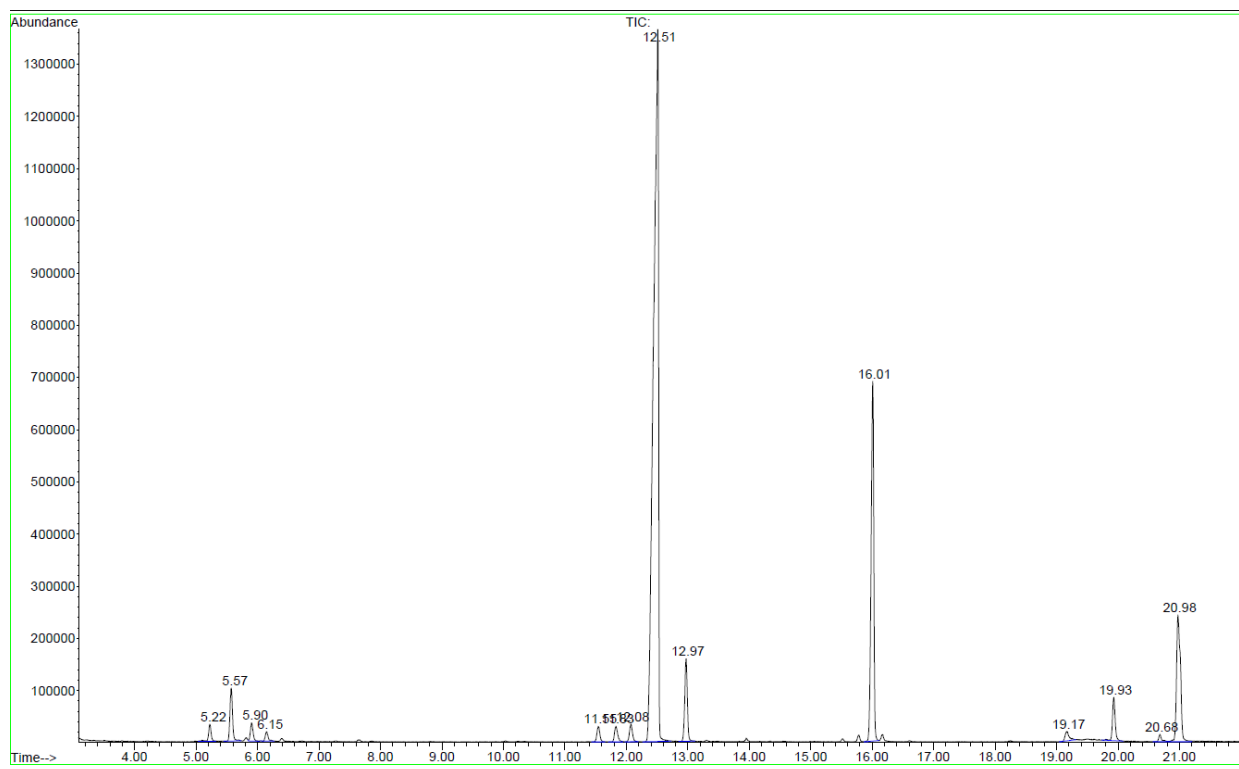


Рис. 3.3.4. Хроматограма спектру цукрів бактерій штаму *E. italicus* ONU547

Визначено склад органічних кислот, що продукують бактерії штаму *E. italicus* ONU547 при вирощуванні у рідкому середовищі MRS впродовж двох діб та виявлено їх здатність до продукції лише оцтової кислоти. Дійсно, оцтова кислота була присутня у рідкій культурі дослідженого ентерокока в концентрації 87,68% від загальної кількості ідентифікованих сполук (таблиця 3.3.4, рис. 3.3.5).

Таблиця 3.3.4

Склад органічних кислот та інших сполук бактерій штаму

E. italicus ONU547

Час утримання (хв)	Сполука	Частка (%)
5,45	оцтова кислота	87,68
17,52	2,3-дигідро-3,5-дигідрокси-6-метил-4Н-піран-4-он	12,32

У науковій літературі рідко зустрічається інформація про органічні кислоти, що продукують бактерії виду *E. italicus*. Відомо, що бактерії цього виду утилізують

цукри шляхом гомоферментативного молочнокислого бродіння, кінцевим продуктом якого є молочна кислота (Fortina et al. 2004). Однак у нашому дослідженні єдиною органічною кислотою виявилась оцтова. Це ймовірно пояснюється аеробними умовами, в яких вирощено бактерії досліджуваного штаму. Дійсно, на прикладі інших видів ентерококів (*E. faecium* та *E. faecalis*) показано, що при вирощуванні їх в аеробних умовах серед органічних кислот, що ними виділяються, зустрічалася лише оцтова кислота (London and Appleman 1962).

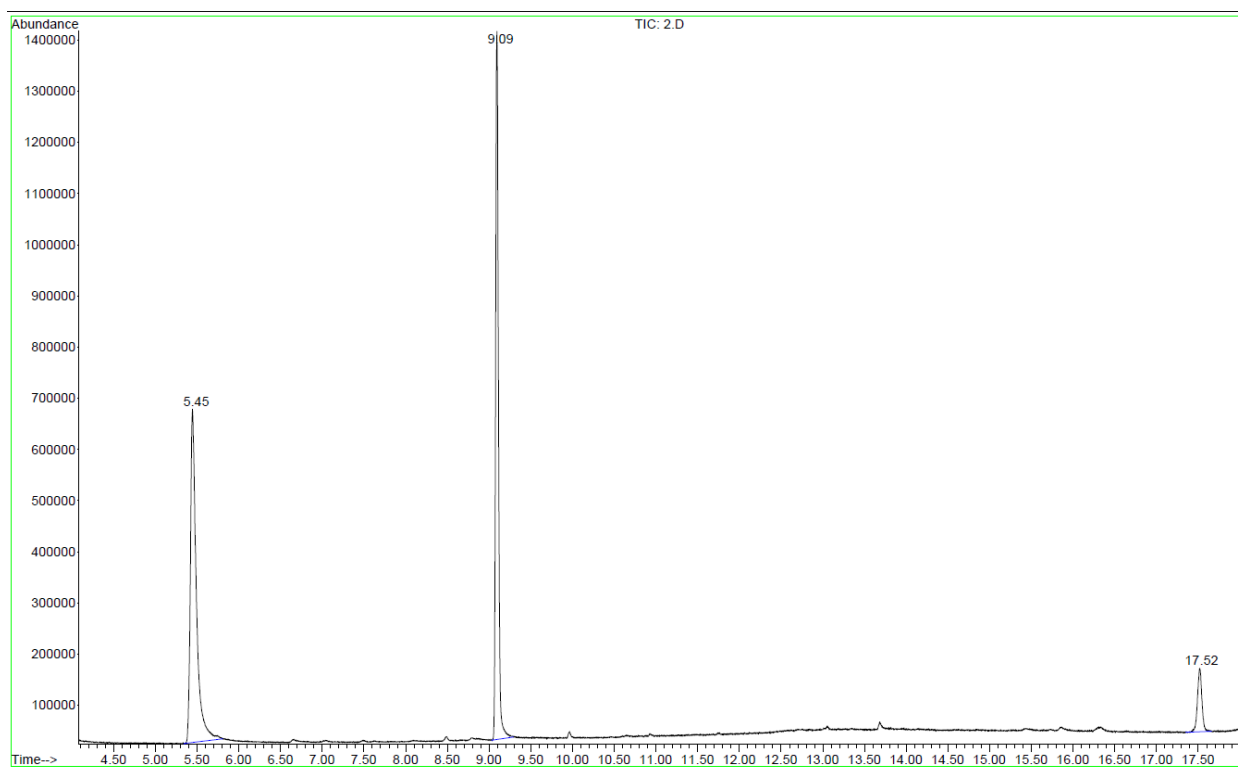


Рис. 3.3.5. Хроматограма складу органічних кислот, що продукують бактерії штаму *E. italicus* ОНУ547

Крім того, нами було встановлено, що в культуральній рідині *E. italicus* ОНУ547 також присутній у невеликій кількості (12,32%) 2,3-дігідро-3,5-дігідрокси-6-метил-4Н-піран-4-он.

Додатково ідентифікацію бактерій продуцента бактеріюцину проводили шляхом визначення спектру жирних кислот на газовому хроматографі «BioRad», за стандартною методикою (Rainey and Oren 2011) з використанням автоматичної системи ідентифікації мікроорганізмів MIDI Sherlock на базі газового хроматографа

з полум'яно-іонізаційним детектором Agilent 7890 (Agilent Technologies, США) (http://www.midi-inc.com/pdf/Sherlock_MIS_Operating_Manual.pdf).

Для бактерій цього виду вперше виявлено, що до їх складу входять як насичені так і ненасичені жирні кислоти (таблиця 3.3.5) (Мерліч та Коротаєва 2018).

Таблиця 3.3.5

Склад жирних кислот бактерій штаму *E. italicus* ОНУ547

Час утримання, хв	Жирна кислота	Частка (%)
0,7137	-	-
0,7345	Пік сольвента	-
1,6165	12:0	0,65
2,0333	-	-
2,1169	-	-
2,1643	14:0	2,47
2,4709	15:0	-
2,7351	16:1 w7c/16:1 w6c 16:1 w6c/16:1 w7c	6,30
2,7676	-	-
2,7857	16:0	26,41
3,1027	17:0	0,18
3,3696	18:1 w7c 18:1 w6c	61,52
3,4171	18:0	1,18
3,7041	19:0 cyclo w8c	0,77
3,9832	20:1 w7c	0,52

Серед насичених виявлено додеканову ($C_{12:0}$), тетрадеканову ($C_{14:0}$), гексадеканову ($C_{16:0}$), гептадеканову ($C_{17:0}$), октадеканову $C_{18:0}$ та циклопропанову ($C_{19:0}$ цикло w8c) кислоти, тоді як серед ненасичених - суміш гексадеценових кислот ($C_{16:1}w7c/C_{16:1}w6c$), суміш октадеценових кислот ($C_{18:1}w7c/C_{18:1}w6c$) та ейкозенову кислоту ($C_{20:1}w7c$). Загалом насичені жирні кислоти бактерій штаму *E. italicus* ОНУ547 складають 31,7% від загальної кількості екстрагованих, тоді як ненасичених – 68,3%. При порівнянні вмісту насичених та ненасичених жирних кислот їх

співвідношення складає приблизно 1:2, отже, в складі клітин досліджуваного ентерококу переважають ненасичені жирні кислоти (Мерліч та Коротаєва 2018).

Аналіз складу ненасичених жирних кислот клітин *E. italicus* ОНУ547 виявив, що найбільший вміст серед них має суміш $C_{18:1} w7c/C_{18:1} w6c$ (90%), тоді як суміші $C_{16:1} w7c/C_{16:1} w6c$ та $C_{20:1} w7c$ наявні в значно меншій кількості та складають 9,2% та 0,8%, відповідно. Серед насичених жирних кислот у найбільшій кількості представлені $C_{16:0}$ (83,4%) та $C_{14:0}$ (7,8%). Жирні кислоти $C_{12:0}$, $C_{17:0}$, $C_{18:0}$ та $C_{19:0}$ цикло $w8c$ присутні в значно меншій кількості та складають лише 2%, 0,6%, 3,7% та 2,4% від загальної кількості насичених жирних кислот, відповідно (Мерліч та Коротаєва 2018).

Аналіз сумарного складу насичених і ненасичених жирних кислот клітин бактерій штаму *E. italicus* ОНУ547 показав, що суміш октадеценових жирних кислот домінує серед інших та складає 61,52%, а гексадеканова і циклопропанова - 26,41% і 0,77%, відповідно (рис. 3.3.6). Отримані нами результати повністю узгоджуються з даними наведеними у єдиній відомій публікації що до складу жирних кислот у *E. italicus* (Fortina et al. 2004). У типового штаму *E. italicus* TP1.5^T домінують жирні кислоти $C_{18:1}$ (60,6%) та $C_{16:0}$ (27,9%) (Fortina et al. 2004). Оскільки штам *E. italicus* ОНУ547 ізольовано нами із рослинного матеріалу (Мерліч та ін. 2017), а штам *E. italicus* TP1.5^T було виділено із молочних продуктів (Fortina et al. 2003; Fortina et al. 2004) то узгодження результатів їх жирнокислотного складу може вказувати на те, що він не залежить від джерела виділення бактерій. Це підтверджує можливість надійного застосування аналізу складу жирних кислот для ідентифікації бактерій виду *E. italicus* (Мерліч та Коротаєва 2018).

Склад жирних кислот (особливо наявність $C_{16:1}$) може бути також використаний для розмежування видів *E. italicus* та *E. camelliae*, оскільки ці два види ентерококів мають високу схожу послідовність нуклеотидів гену 16S рРНК (на 99,2%) (Sukontasing et al. 2007). У наших дослідженнях концентрація ненасичених жирних кислот $C_{16:1}$ у *E. italicus* ОНУ547 складала лише 6,3% від загальної кількості виділених жирних кислот, тоді як для *E. camelliae* FP15-1^T їх концентрація складає 30,5%. Крім того, концентрація іншої головної жирної кислоти - $C_{18:1}$ була значно

меншою для *E. camelliae* FP15-1^T (20,9%) (Sukontasing et al. 2007) (Мерліч та Коротчаєва 2018).

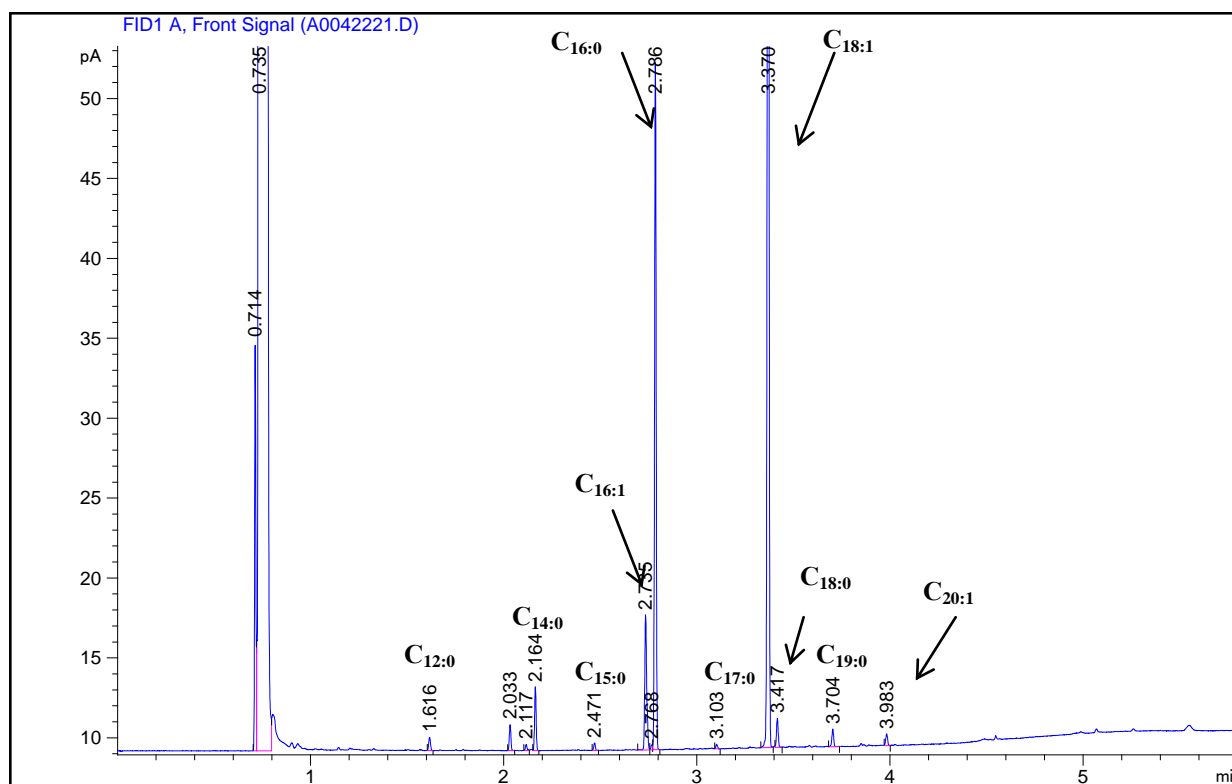


Рис. 3.3.6. Хроматограма спектру жирних кислот бактерій штаму *E. italicus* ОНУ547

Незважаючи на те, що інші жирні кислоти, такі як $C_{12:0}$, $C_{14:0}$, $C_{17:0}$, $C_{18:0}$ та $C_{20:1}$ також є у складі клітин *E. italicus* ОНУ547, як і у *E. camelliae* FP15-1^T (Sukontasing et al 2007), проте вони визначені в значно меншій кількості та складають, відповідно, 0,65%, 2,47%, 0,18%, 1,18% та 0,52% від загальної кількості виділених жирних кислот (Мерліч та Коротчаєва 2018).

Отже, проведені дослідження показали, що спектр жирних кислот бактерій *E. italicus* може слугувати важливою характеристикою цього виду і ознакою, яка диференціює його від генетично близького за послідовністю нуклеотидів 16S рРНК виду *E. camelliae* (Мерліч та Коротчаєва 2018).

Встановлено, що бактерії штаму *E. italicus* ОНУ547 чутливі до хлорамфеніколу, рифампіцину, левофлоксацину, ванкоміцину, тейкопланіну, нітрофурантоїну

та стрептоміцину НС, середньо чутливі до ципрофлоксацину та резистентні до пеніциліну, ампіциліну, еритроміцину, тетрацикліну, гентаміцину НС, кінупрестину-дальфопрестину (табл. 3.3.6).

Таблиця 3.3.6

Чутливість бактерій штаму *E. italicus* ОНУ547 до антибіотиків

Антибіотик	Чутливість
Пеніцилін	-
Ампіцилін	-
Еритроміцин	-
Тетрациклін	-
Хлорамфенікол	+
Рифампіцин	+
Ципрофлоксацин	+ -
Левовфлоксацин	+
Ванкоміцин	+
Тейкопланін	+
Нітрофурантоїн	+
Гентаміцин НС	-
Стрептоміцин НС	+
Кінупрестин- дальфопрестин	-

Примітка: чутливі (+), середньо чутливі (+ -), стійкі (-)

В наукових джерелах зустрічаються повідомлення, що стосуються досліджень стійкості до антибіотиків бактерій виду *E. italicus*. Дослідниками повідомляється про пригнічення антибіотиком ванкоміцином бактерій семи штамів *E. italicus*, які було отримано із італійських сирів (Fortina et al. 2004). Крім того, було досліджено резистентність до антибіотиків 30 ізолятів *E. italicus* із молочних продуктів, більшість яких складала також сири із Італії та показано, що хлорамфенікол, ампі-

цилін, гентаміцин, бацитрацин, еритроміцин та ванкоміцин пригнічували їх ріст, однак тетрациклін не інгібував ріст бактерій деяких ізолятів (Maietti et al. 2007). В іншій публікації вивчено чутливість бактерій штаму *E. italicus* GGN10 із туніського молока до ванкоміцину, гентаміцину та β -лактамних антибіотиків та показано, що гени стійкості до них у цих бактерій не присутні (Gaaloul et al. 2014).

Порівнюючи результати, які отримано в нашому дослідженні з результатами, описаними у наукових публікаціях можна відмітити, що чутливість бактерій штаму *E. italicus* ОНУ547 із квашеної капусти до ванкоміцину узгоджується з результатами вивчення резистентності до антибіотиків бактерій штамів *E. italicus* із молочних продуктів та молока (Fortina et al. 2004; Gaaloul et al. 2014; Maietti et al. 2007). Крім того, чутливість *E. italicus* ОНУ547 до хлорамфеніколу та стійкість до тетрацикліну також узгоджується з результатами отриманими при вивченні ізолятів *E. italicus* із молочних продуктів, однак на відміну від наших результатів бактерії цих ізолятів не мали стійкості до ампіциліну, еритроміцину та гентаміцину (Maietti et al. 2007), що можна пояснити різним походженням порівнюваних ізолятів.

Ідентифікацію виду як *E. italicus* було підтверджено також за допомогою секвенування гену 16S рРНК. Спочатку у результаті проведення ПЛР з праймерами fD1 та rD1 до гену 16S рРНК (Weisburg et al. 1991) було накопичено амплікони гену, а в подальшому шляхом електрофоретичного розділення підтверджено їх наявність у достатній кількості. У результаті електрофорезу виявлено фрагмент ДНК розміром 1500 п.н., який являє собою ген 16S рРНК штаму-продуцента бактеріоцину (рис. 3.3.7) (Мерліч та ін. 2017b).

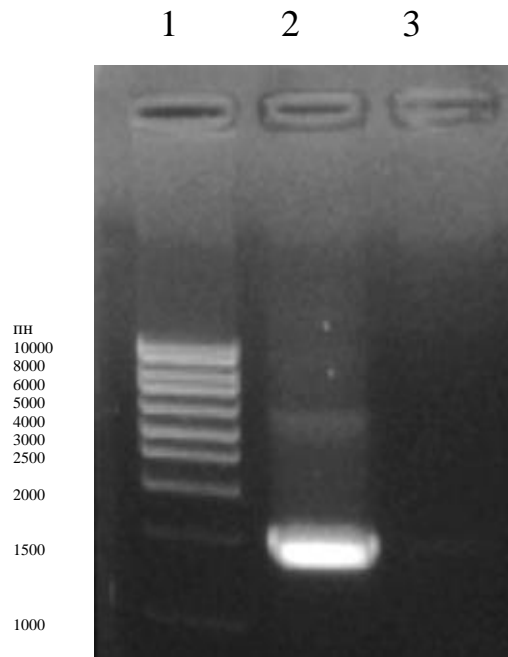


Рис. 3.3.7. Електрофореграма продуктів ампліфікації

Примітка: 1 - маркер молекулярної маси, 2 - амплікон гена 16S рРНК штама-продуцента бактеріоцину, 3 – негативний контроль.

Порівняння визначеної послідовності нуклеотидів гена 16S рРНК з результатами бази даних GenBank підтвердило ідентифікацію продуцента бактеріоцину як *E. italicus* (рис. 3.3.8) (Мерліч та ін. 2017b). Послідовність гена 16S рРНК бактерій штаму *E. italicus* ОНУ547 задепоновано нами в GenBank з наданим номером доступу MH509189.

Отже, проведені нами дослідження є першим повідомленням про виділення бактерій виду *E. italicus* зі здатністю до продукції бактеріоцинів з рослинного матеріалу.

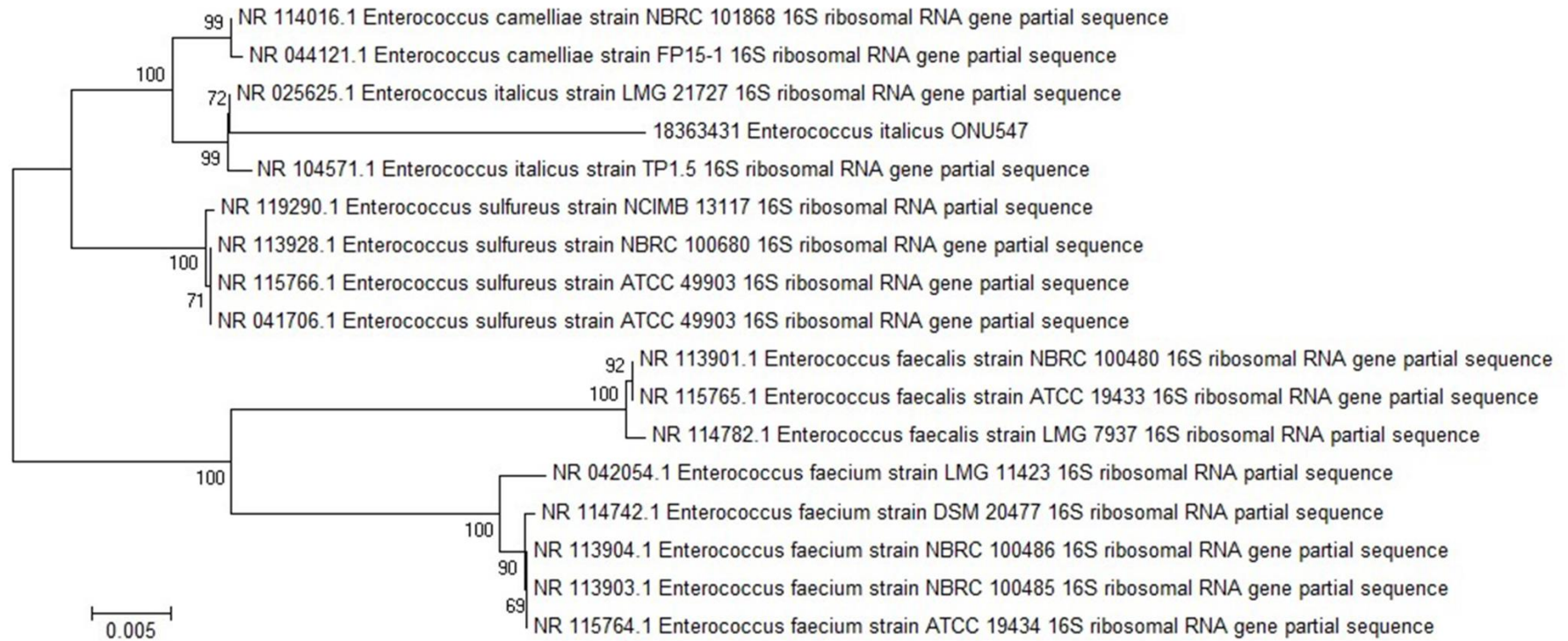


Рис. 3.3.8. Дендрограма спорідненості штаму *E. italicus* ONU547 з іншими ентерококами бази даних GenBank

В науковій літературі описано виділення ентерококів з рослинних джерел, але серед них не було відомо бактерій виду *E. italicus* (Müller et al. 2001; Mundt 1963). З літературних даних відомо, що бактерії виду *E. italicus* вперше ізольовано відносно недавно з італійських сирів домашнього виробництва (Fortina et al. 2004). Штам *E. italicus* ОНУ547, виділений під час дослідження, для довгострокового зберігання внесено до колекції мікроорганізмів Одеського національного університету імені І.І. Мечникова (Мерліч та ін. 2017b) та подано для реєстрації та зберігання до Державного депозитарію.

РОЗДІЛ 4

ВИДІЛЕННЯ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРІОЦИНУ *E. ITALICUS*

ОНУ547

4.1. Спектр антимікробної дії бактеріоцину *E. italicus* ОНУ547

На наступному етапі дослідження визначено чутливість низки умовно патогенних, псувних і фітопатогенних бактерій та близькоспоріднених МКБ тест-штамів бактерій до антимікробної дії бактеріоцину НОР *E. italicus* ОНУ547 за допомогою метода агарових лунок. Найбільша пригнічувальна активність встановлена проти *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 (320 ВО/мл) (табл. 4.1.1). Бактерії цього виду викликають псування запакованої під вакуумом шинки (Kalschne et al. 2015), та домінують в м'ясних копчених продуктах харчування (Samelis et al. 2000). Серед інших досліджених грампозитивних бактерій чутливими до бактеріоцину виявились *Listeria ivanovii* та *Brochothrix thermosphacta* (табл. 4.1.1).

Таблиця 4.1.1

Чутливість бактерій тест-штамів до антимікробної дії бактеріоцину *E. italicus* ОНУ547

Штам-індикатор	Антибактеріальна активність, ВО/мл
1	2
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> JCM 1157	320
<i>Listeria ivanovii</i> subsp. <i>ivanovii</i> 20750	80
<i>Brochothrix thermosphacta</i> DSMZ 20171	40
<i>Escherichia coli</i> CIP 76.24	-
<i>Pediococcus pentosaceus</i> DMST 18752	-
<i>Listeria innocua</i> CIP 80.11	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	-
<i>Rhizobium radiobacter</i> C58	-
<i>Rhizobium vitis</i> UA6	-
<i>Rhizobium rhizogenes</i> 15834	-

Продовж. табл. 4.1.1

1	2
<i>Erwinia carotovora</i> ZM1	-
<i>Ralstonia solanacearum</i> УКМ В-1109	-
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> 8511	-
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> D13	-

Антимікробна активність до *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* 20750 складала 80 ВО/мл. Активність бактеріоцинів *E. italicus* до *L. ivanovii* було описано також (Gaaloul et al. 2014). Відомо, що *L. ivanovii* є одним із двох патогенних видів лістерій (інший – *Listeria monocytogenes*) (Rocourt and Mollaret 1988). Вважалось, що на відміну від *L. monocytogenes*, бактерії виду *L. ivanovii* інфікують лише жуйних тварин (Vázquez-Boland et al. 2001). Однак встановлено, що ця бактерія також є опортуністичним патогеном людини (Guillet et al. 2010).

Активність проти *Brochothrix thermosphacta* DSMZ 20171 становила 40 ВО/мл. Це повідомлення вперше вказує на інгібувальну активність бактеріоцину *E. italicus* проти *B. thermosphacta*. Бактерії цього виду спричиняють псування м'ясних харчових продуктів та часто зустрічаються в сосисках, виготовлених зі м'яса свиней (Dias et al. 2013a; Cocolin et al. 2004).

До тест-штамів *Listeria innocua* та *Pediococcus pentosaceus* не виявлено інгібувальної активності. Бактеріоцин також не впливав на штами грам негативних бактерій, використаних у нашому дослідженні, що узгоджується з результатами (Gaaloul et al. 2014). Бактеріоцини ентерококів в більшості випадків є активними лише проти грампозитивних бактерій (Joosten et al. 1996; Eguchi et al. 2001; Floriano et al. 1998; Yamamoto et al. 2003; Audisio et al. 2005; Dezwaan et al. 2007). Зустрічаються лише поодинокі повідомлення про їх активність проти бактерій, з клітинною стінкою грамнегативного типу (de Kwaadsteniet et al. 2005; Gálvez et al. 1989). Крім того, культуральна рідина бактерій штаму *E. italicus* ОНУ547 з вихідним рН не показала пригнічувальної активності проти жодного використаного в роботі штама грамнегативних фітопатогенних бактерій. Це пояснюється незначною

продукцією органічних кислот штамом *E. italicus* ОНУ547. Дійсно, рН культурального середовища *E. italicus* ОНУ547 складав лише близько 5,0, що узгоджується з даними літератури (Gaaloul et al. 2014). Отже, а ні вивчений ентероцин, а ні культуральна рідина з вихідним рН добової культури *E. italicus* ОНУ547, не проявили інгібувальної дії до фітопатогенних бактерій *in vitro* (Мерліч та ін. 2017а).

4.2. Виділення та очищення бактеріоцину

З метою очищення та концентрування бактеріоцину *E. italicus* ОНУ547 було випробувано декілька комбінацій біохімічних методів (Мерліч та ін. 2017b). Перша з них складалася з преципітації за допомогою сульфата амонію та іонообмінної і гідрофобної хроматографії з використанням картриджів Sep-Pak Vac 12cc Accell Plus CM, Sep-Pak Vac 12cc Accel Plus QMA і Sep-Pak Vac C₈ та ОФ-ВЕРХ з колонкою C₈.

Активність над осадової рідини (НОР) перед преципітацією сульфатом амонію, визначена при перевірці проти індикатора *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157, складала 320 ВО/мл, а після концентрування бактеріоцину збільшилася у два рази і досягла 640 ВО/мл. Після катіонообмінної хроматографії антимікробна активність спостерігалась лише для фракцій, отриманих шляхом елюції буфером В, що містив 30% ацетонітрилу (рис. 4.2.1).

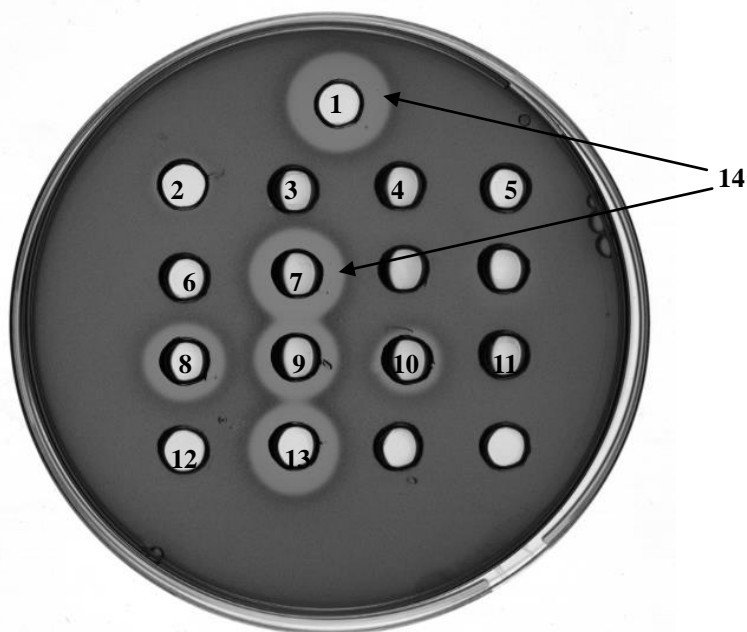


Рис. 4.2.1. Антибактеріальна активність фракцій іонообмінної хроматографії з використанням аніонного (СМ) та катіонного (QМА) картриджив.

Примітка: СМ: 1 – контроль, 2 – внесена проба, 3-4 – промивання буфером А, 5-6 – промивання буфером В, 7 – елюція буфером С; QМА: 8 – внесена проба, 9-10 – промивання буфером А, 11-12 – промивання буфером В, 13 – елюція буфером С; 14 – зони пригнічення росту індикатору

Відсутність активності у фракціях на етапах завантаження зразка або промивання вказує на специфічність бактеріоцину до негативно зарядженого матриксу аніонного картриджу. У випадку використання катіонного картриджу з позитивно зарядженим матриксом активність була присутня у фракціях завантаження та промивання, що вказує на низьку специфічність цього матрикса до бактеріоцину. Отже результати іонообмінної хроматографії вказують на катіонну природу бактеріоцину *E. italicus* ОНУ547 (Мерліч та ін. 2017b).

Активну фракцію після елюції катіонообмінної хроматографії було внесено до гідрофобного картриджу Sep-Pak Vac C₈. У результаті антимикробну активність виявлено лише у фракції елюції. Це означає, що бактеріоцин був зв'язаний з гідрофобним матриксом картриджа, отже, сам по собі він також є гідрофобним (Мерліч та ін. 2017b) (рис. 4.2.2.).

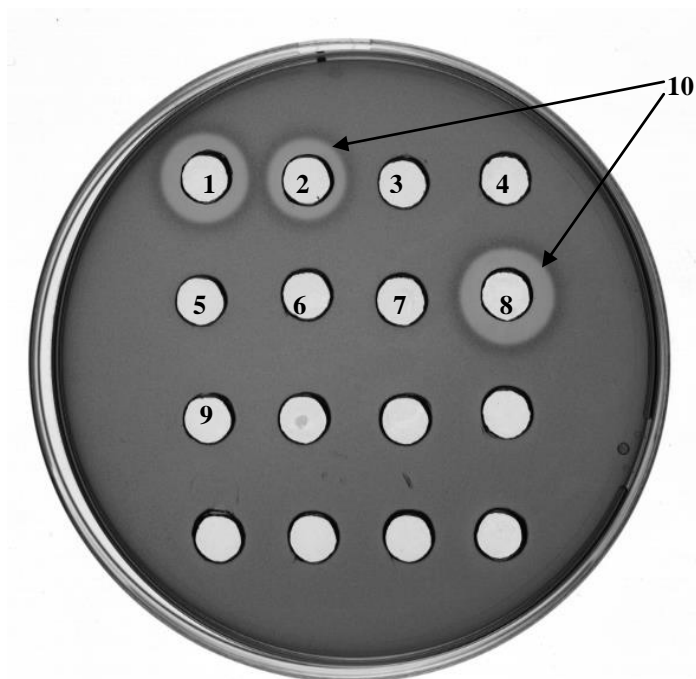


Рис. 4.2.2. Антибактеріальна активність фракцій бактеріоцину *E. italicus* ОНУ547, отриманих шляхом гідрофобної хроматографії з картриджем Sep-Pak Vac C₈

Примітка: 1 – контроль, 2 – контроль розведений у п'ять разів, 3 - 6 – завантаження проби, 7 - промивання 0,2% трифтороцтовою кислотою, 8 - 9 – елюція 100% ацетонітрилом; 10 – зони відсутності росту індикаторного мікроорганізму

Після гідрофобної хроматографії 100 мкл активної фракції було внесено до колонки RP C₈ (Symmetry C₈, 3,5 мкм) для проведення ОФ-ВЕРХ (рис. 4.2.3). Два невеликі піки з часом утримання 8-9 хвилин були відібрані разом та показали інгібувальну активність до індикатора *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 (рис. 4.2.4) (Merlich 2017). Цей результат підтверджує відповідність двох піків речовини бактеріоцину (Merlich та ін. 2017b). Однак, проявлена після ОФ-ВЕРХ антимикробна активність була дуже низькою та становила лише 20 ВО/мл, що вказує на втрату значної кількості бактеріоцину при очищенні даним методом хроматографії (табл. 4.2.1). Це може бути пояснено високою гідрофобністю досліджуваного бактеріоцину та його незворотнім зв'язуванням з носієм. Так, з літературних даних відомо про повну втрату активності, яка спостерігалась при очищенні ентероцину 62-6 з вираженими гідрофобними властивостями за допомогою ОФ-ВЕРХ з використанням

колонки C₁₈, що авторами пояснено незворотнім зв'язуванням цього бактеріоцину з колонкою (Dezwaan et al. 2007).

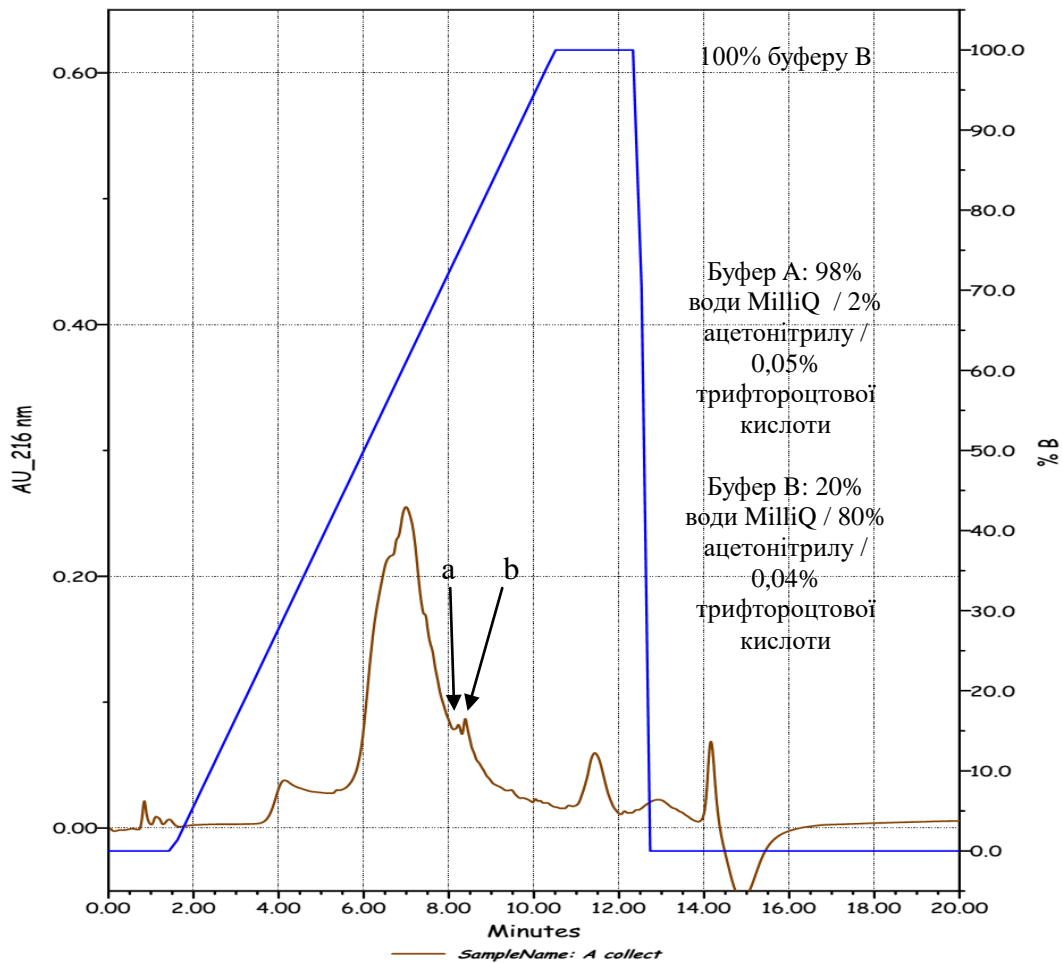


Рис. 4.2.3. Хроматограма ОФ-ВЕРХ частково очищеного бактеріоцину з *E. italicus* ONU547 отримана методом градієнтної елюції;

Примітка: a, b – піки, що відповідали частково очищеному бактеріоцину

Зменшення загальної антибактеріальної активності бактеріоцину після очищення співпадає з даними авторів попередніх публікацій (Aymerich et al. 1996; Gutiérrez et al. 2005).

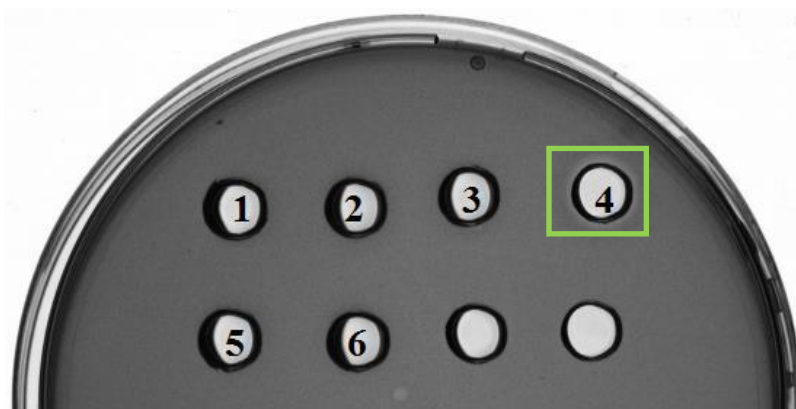


Рис. 4.2.4 Активність фракцій бактеріоцину *E. italicus* ОНУ547 після ОФ-ВЕРХ з колонкою C_8 , отриманих методом градієнтної елюції.

Примітка: 1- завантаження проби; 2 - час утримання 3,5:5 хв; 3 – 6:7 хв; 4 – 8:9 хв; 5 – 10:11 хв, 6 – 12:13 хв.

Більш ефективною з точки зору виходу активності для очищення бактеріоцину виявилась друга група методів, яка включала гідрофобну хроматографію з картриджем C_8 та іонообмінну хроматографію з використанням хроматографічної системи АКТА Explorer та колонки HiPrep QXL (рис. 4.2.5, табл. 4.2.1).



Рис. 4.2.5. Антимікробна активність фракції бактеріоцину *E. italicus* ОНУ547, отриманої шляхом використання комбінації гідрофобної хроматографії з картриджем C_8 та іонообмінної хроматографії з системою АКТА Explorer та колонкою HiPrep QXL проти індикаторного мікроорганізму *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157.

Примітка: 1 – 8: подвійні серійні розведення бактеріоцину.

Ця комбінація хроматографічних методів призвела до виділення фракції

бактеріоцину з найвищою активністю до індикаторного мікроорганізму *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 (5120 ВО/мл) (табл. 4.2.1) (Мерліч та ін. 2017b).

Таблиця 4.2.1.

Порівняння ефективності методів концентрування та очищення бактеріоцину *E. italicus* ОНУ547

Комбінація методів концентрування та очищення	Активність ВО/мл
НОР (контроль)	320
Преципітація сульфатом амонію, іонообмінна хроматографія, гідрофобна хроматографія та ОФ-ВЕРХ	20
Іонообмінна хроматографія з системою АКТА Explorer та гідрофобна хроматографія	5120

Отже, шляхом використання іонообмінної хроматографії з системою АКТА Explorer та гідрофобної хроматографії активність бактеріоцину зросла в 16 разів.

4.3. Вплив температури на активність бактеріоцину

У проведених дослідженнях встановлено, що після нагрівання НОР активність бактеріоцину збільшується (табл. 4.3.1, рис. 4.3.1). Нагрівання при 80 °С протягом 15 та 30 хв збільшує антимікробну активність НОР у чотири рази порівняно з необробленим контролем і у результаті активність складала 1280 ВО/мл. Такий саме вплив спостерігався після кип'ятіння протягом 15 хв. У випадку автоклавування при 121 °С протягом 15 хв активність збільшувалась удвічі, досягаючи 640 ВО/мл (Мерліч та ін. 2017b).

Як не дивно, але активність частково очищеного бактеріоцину (ЧОБ) не змінювалась після нагрівання при 80 °С впродовж 15 та 30 хв (Мерліч та ін. 2017b). Більшість публікацій повідомляють про стабільність бактеріоцинів після нагрівання (Sifour et al. 2014; Belgacem et al. 2012; Saelim et al. 2015; Malini and Savitha 2012;

Line et al. 2008; Ribeiro et al. 2012; Song et al. 2014; Saad et al. 2015; Seo et al. 2014; Kabuki et al. 2007; Cintas et al. 1997; Eguchi et al. 2001).

Таблиця 4.3.1.

Вплив температурної обробки на активність бактеріоцину *E. italicus* ОНУ547

Температура і час обробки	Активність (ВО/мл)
НОР (без обробки)	320
НОР (80 °С, 15 хв)	1280
НОР (80 °С, 30 хв)	1280
НОР (100 °С, 15 хв)	1280
НОР (121 °С, 15 хв)	640
ЧОБ (без обробки)	5120
ЧОБ (80 °С, 15 хв)	5120
ЧОБ (80 °С, 30 хв)	5120

Інформація про збільшення активності бактеріоцину після температурної обробки, як показано в нашій роботі, відома. Описано збільшення інгібувальної активності бактеріоцину *Lactobacillus salivarius* щодо *S. aureus* після нагрівання при 80 °С. При цьому діаметр зон затримки росту зростав з вихідного 1,9 см до 2,6 см. Подібний ефект спостерігався по відношенню до бактеріоцину іншого виду лактобацил - *Lactobacillus acidophilus* - нагрівання при 60 °С підвищувало його активність (Eid et al. 2016).

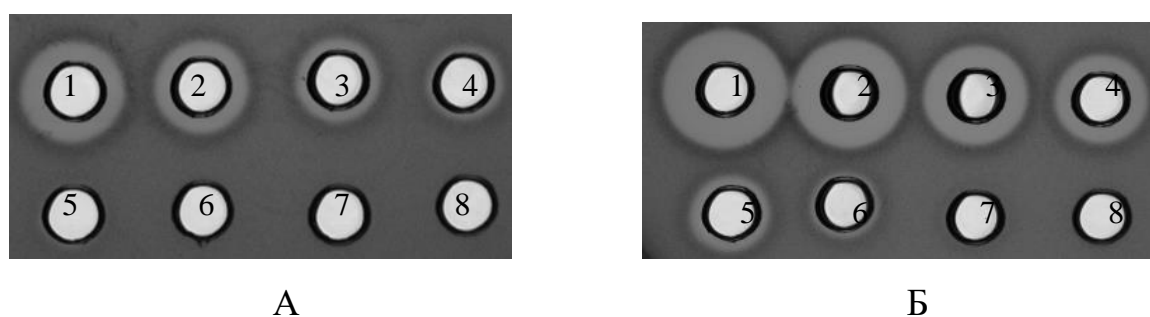


Рис 4.3.1. Антагоністична активність бактеріоцину з НОР *E. italicus* ОНУ547.

Примітка: до (А) і після нагрівання при 80 °С впродовж 15 хв (Б) до *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157; 1–8: подвійні серійні розведення бактеріоцину.

У нашому дослідженні активність бактеріоцину *E. italicus* збільшувалася після нагрівання вдвічі або більше.

Відомо, що нагрівання впливає на гідрофобні зв'язки, а саме спричиняє їх ослаблення (Остерман 1985). У наших експериментах по очищенню бактеріоцину *E. italicus* ОНУ547 показано його високу гідрофобність та, можна припустити, що у водному розчині гідрофобні молекули бактеріоцину могли з'єднуватися між собою. Нагрівання при високих температурах могло призвести до зменшення гідрофобності бактеріоцину, що, можливо, призвело до роз'єднання молекул цієї антимікробної сполуки та, відповідно, до покращення її розчинності. Це може збільшити дифузію бактеріоцину в агар при перевірці активності методом агарових лунок та, відповідно, збільшити прояв його дії. Дане припущення підтверджується відсутністю впливу нагрівання на ЧОБ, який пройшов етапи очищення, що могло також призвести до роз'єднання його молекул.

Можна передбачити, що виявлений ефект може бути перспективним для використання дослідженого бактеріоцину для захисту харчових продуктів, виробництво яких включає високотемпературну обробку.

4.4. Молекулярна маса бактеріоцину

Молекулярну масу бактеріоцину *E. italicus* ОНУ547 визначали шляхом електрофоретичного розділення складових НОР та ЧОБ за допомогою трицин-ДСН-ПААГ з подальшим забарвленням кумасі блакитним та перевіркою антимікробної активності розділених молекул проти індикаторного мікроорганізму *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157. Після розділення складових НОР на отриманій електрофореграмі спостерігалася лише одна полоса з молекулярною масою біля 3 кДа (рис. 4.4.1 а). У результаті електрофорезу складових фракції ЧОБ було виявлено три полоси, молекулярні маси яких становили приблизно 2, 3 та 8 кДа.

Після перевірки впливу розділених білкових молекул на ріст індикаторного мікроорганізму *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 антимікробну активність проявили як складові НОР, так і фракції ЧОБ (рис. 4.4.1 б). Дійсно, у випадку НОР бактеріоцин, що був представлений у вигляді полоси з молекулярною масою в розмірі 3 кДа

спричиняв утворення зони пригнічення росту індикаторного мікроорганізму. Це підтверджує відповідність виявленої полоси саме бактеріоцину.

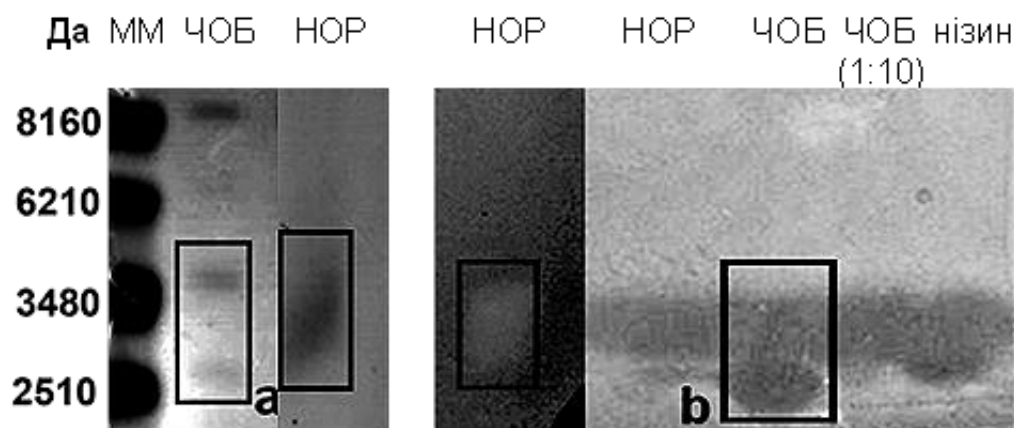


Рис. 4.4.1. Електрофореграма трицин-ДСН-ПААГ бактеріоцину *E. italicus* ОНУ547 (а) та зони відсутності росту *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 (b), спричинені дією бактеріоцину

Примітка: ММ – маркери молекулярної маси: міоглобін I (8160 Да), міоглобін II (6210 Да), глюкагон (3480 Да), міоглобін III (2510 Да), SIGMA-ALDRICH, США, ЧОБ – частково очищений бактеріоцин, НОР – надосадова рідина, ЧОБ (1:10) – частково очищений бактеріоцин, розведений в 10 разів

При перевірці антимікробної активності розділених складових фракції ЧОБ виявлено, що дві із них, представлені у вигляді полос з молекулярними масами 2 та 3 кДа, проявили інгібувальну активність, що свідчить про їх належність саме до компонентів досліджуваного бактеріоцину (Merlich et al. 2017). Можна припустити, що очищення бактеріоцину призводило до його розділення на компоненти, які до цього були з'єднані разом та, вірогідно, формували єдину макромолекулу. Існує також ймовірність того, що бактерії штаму *E. italicus* ОНУ547 продукували декілька бактеріоцинів, які в неочищеному вигляді були зв'язаними між собою, а після очищення розділилися. У літературі інформації про бактеріоцини, що продукуються бактеріями виду *E. italicus*, мало. Із туніського молока було виділено *E. italicus*, який синтезував ентероцин А та ентероцин В (Gaaloul et al. 2014). Згідно з публікаціями, молекулярна маса ентероцину А складає 4828 Да (Aumerich et al.

1996), а ентероцину В - 5479 Да (Casaus et al. 1997).

У нашому дослідженні, молекулярна маса двох бактеріоцинів або компонентів одного бактеріоцину *E. italicus* дорівнювала 2 та 3 кДа, що вказує на можливість продукції даним штамом МКБ бактеріоцину іншого типу (Мерліч та ін. 2017b). Бактеріоцин ентерококів подібного розміру вже було описано. Було повідомлено про ентероцин W, який синтезується представником іншого виду (*E. faecalis* NKR-4-1) із тайського ферментованого продукту (риби пла ра). До його складу входить також два компоненти: ентероцин W α (3256,5 Да) та ентероцин W β (2728,6 Да) (Sawa et al. 2012).

4.5. Вплив бактеріоцину на утворення біоплівок бактеріями тест-штамів

Для вивчення впливу бактеріоцину на утворення біоплівок в якості індикаторних штамів було використано *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 як модельний штам який проявляє чутливість до бактеріоцинів лактобактерій (Hwahnlem et al. 2014; Н-Kittikun et al. 2015), *P. aeruginosa* PAO1, який є широко відомим як модель для роботи з бактеріальними біоплівками (Jackson et al. 2004; Klockgether et al. 2010) та штам *R. radiobacter* C58 – представник патогенного виду ризобій, який уражує виноград Півдня України (Ліманська та ін. 2011).

Як видно на рис. 4.5.1 – 4.5.2, бактеріоцин *E. italicus* ОНУ547 пригнічує утворення біоплівок бактерій *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157, так само, як і ріст планктонних клітин цього індикаторного штаму. Спостерігалось пригнічення утворення біоплівок *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 на 52,5%, що вказує на здатність досліджуваного бактеріоцину інгібувати процес формування біоплівок (Мерліч та ін. 2017b).

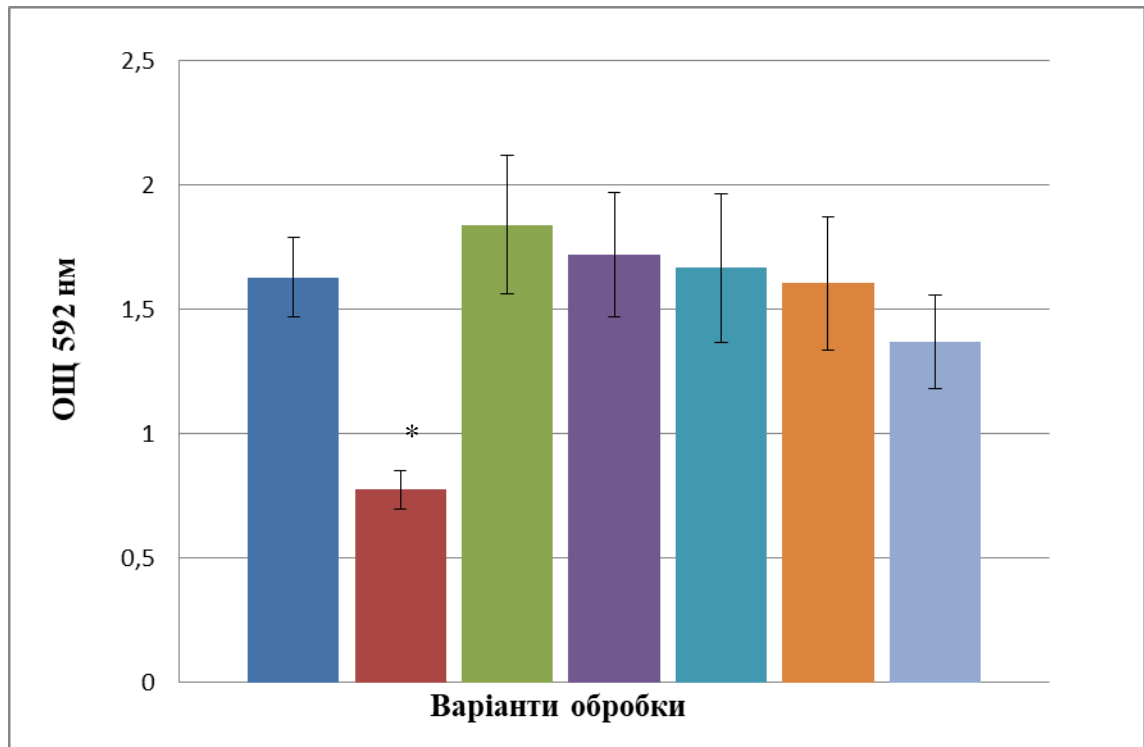


Рис. 4.5.1. Вплив бактеріоцину *E. italicus* ОНУ547 на утворення біоплівки бактеріями *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157

Примітка:

■ - Контроль, ■ - очищений бактеріоцин, ■ - очищений бактеріоцин 1/10, ■ - очищений бактеріоцин 1/100, ■ - НОР, ■ - НОР 1/10, ■ - НОР 1/100;

* - статистично достовірно ($p < 0,05$).

На відміну від очищеного бактеріоцину, НОР не показала значного інгібувального ефекту на утворення біоплівки. Натомість інгібувальну активність на ріст планктонних клітин *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 показано як очищеним бактеріоцином, так і НОР. Ріст планктонних клітин пригнічувався на 20,7 та 7,2%, відповідно (рис. 4.5.2).

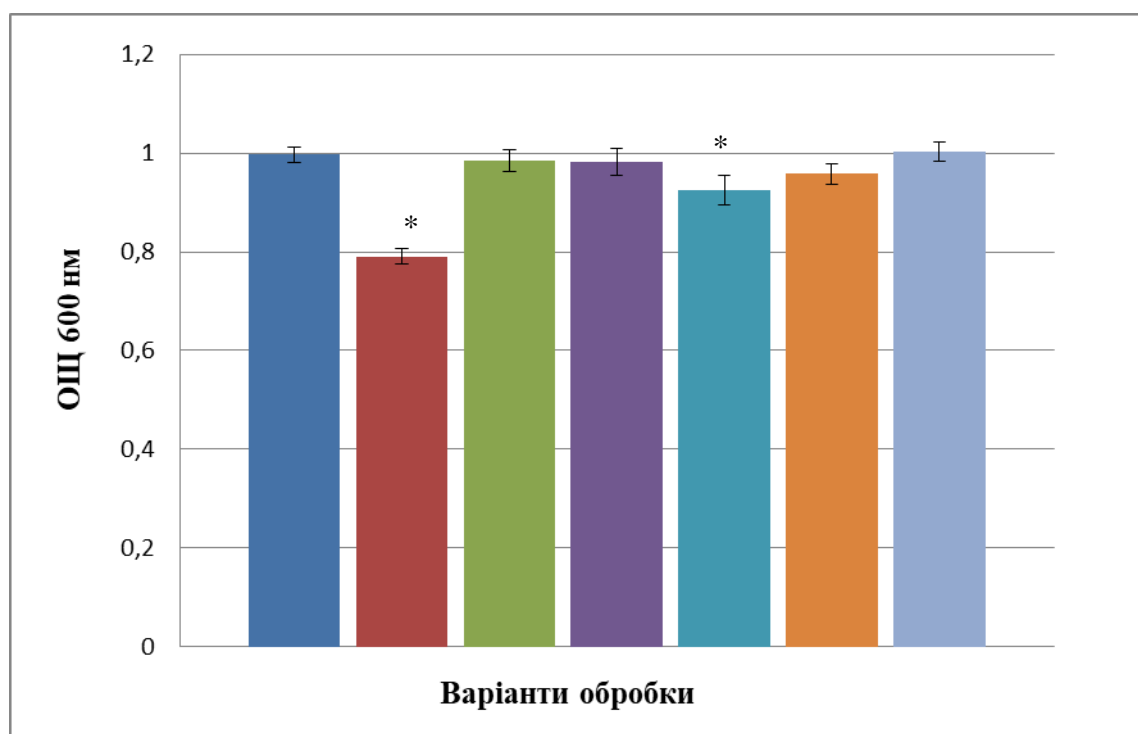


Рис. 4.5.2. Вплив бактеріоцину *E. italicus* ОНУ547 на ріст планктонних бактерій *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157

Примітка:

■ - Контроль, ■ - очищений бактеріоцин, ■ - очищений бактеріоцин 1/10, ■ очищений бактеріоцин 1/100, ■ - НОР, ■ - НОР 1/10, ■ - НОР 1/100, * - статистично достовірно ($p < 0,05$).

Очищений бактеріоцин та НОР *E. italicus* ОНУ547 інгібували утворення біоплівки бактеріями штаму *P. aeruginosa* PAO1 (Мерліч та ін. 2017b). Очищений бактеріоцин зменшував утворення біоплівок даного штаму на 48,0%. НОР інгібувала утворення біоплівок на 41,4% (рис. 4.5.3). Подібні результати були описаними в науковій літературі, коли утворення біоплівок *P. aeruginosa* було зменшено на 50 – 60% метаболітами лактобактерій, хоча, їх склад не був повідомлений та продуценти виду *E. italicus* не вивчалися (El-Deeb et al. 2015).

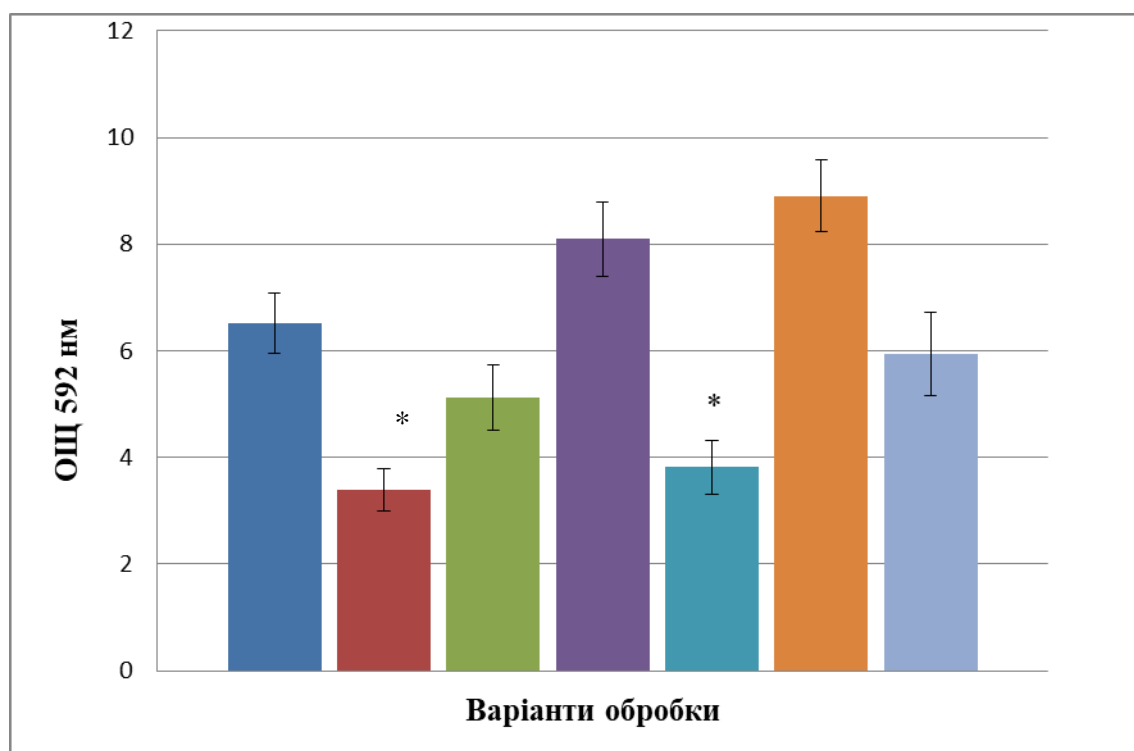


Рис. 4.5.3. Вплив бактеріоцину *E. italicus* ОНУ547 на утворення біоплівки бактеріями *P. aeruginosa* PAO1

Примітка:

■ - Контроль, ■ - очищений бактеріоцин, ■ - очищений бактеріоцин 1/10, ■ - очищений бактеріоцин 1/100, ■ - НОР, ■ - НОР 1/10, ■ - НОР 1/100.

* - статистично достовірно ($p < 0,05$)

Із наукової літератури відомо, що бактеріоцин МКБ *L. acidophilus* пригнічує утворення біоплівки *P. aeruginosa* P7 (Al-Mathkhury et al. 2011). Цікаво, що в нашому дослідженні ні очищений бактеріоцин, ні НОР не інгібували ріст планктонних індикаторних бактерій, але очищений бактеріоцин, розведений у 100 разів та НОР – у 10 разів пригнічували ріст планктонних клітин *P. aeruginosa* PAO1 на 36,1 та 27,6%, відповідно (Рис. 4.5.4).

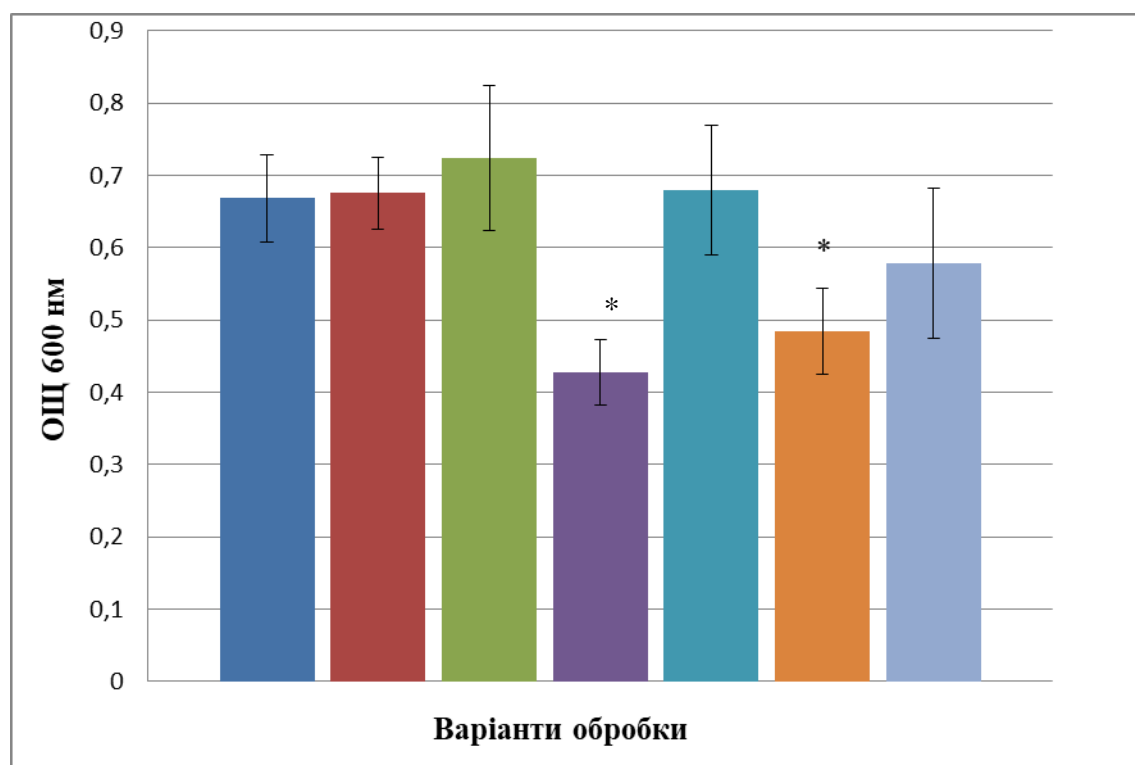


Рис. 4.5.4. Вплив бактеріоцину *E. italicus* ОНУ547 на ріст планктонних бактерій *P. aeruginosa* PAO1;

Примітка: * - статистично достовірно ($p < 0,05$);

■ - Контроль, ■ - очищений бактеріоцин, ■ - очищений бактеріоцин 1/10, ■ - очищений бактеріоцин 1/100, ■ - НОР, ■ - НОР 1/10, ■ - НОР 1/100.

Таким чином, нами вперше встановлено інгібування утворення біоплівки *P. aeruginosa* бактеріоцином, що продукують бактерії виду *E. italicus*.

Для підтвердження того, що пригнічувальний вплив на утворення біоплівки та на ріст планктонних клітин був зумовлений саме бактеріоцином, а не іншим продуктом метаболізму бактерій *E. italicus* ОНУ547, виконано обробку очищеного бактеріоцину протеолітичним ензимом протеїназою К з подальшою перевіркою його активності. У результаті, після обробки очищеного бактеріоцину протеїназою К інгібувальна активність проти утворення біоплівки *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 зникла повністю (рис. 4.5.5). Ці результати вказують саме на бактеріоцину природу інгібування утворення біоплівки (Мерліч та ін. 2016).

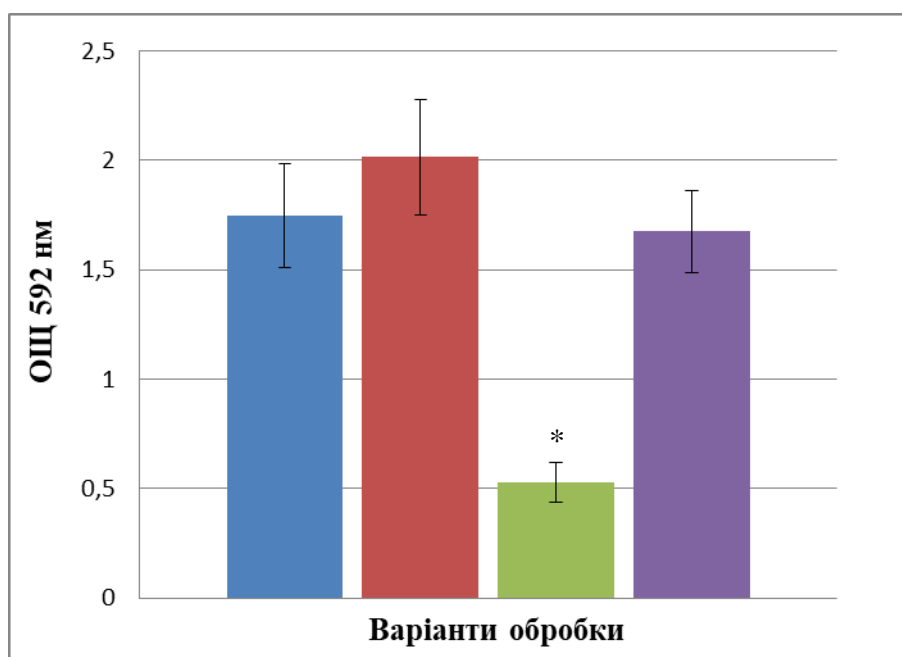


Рис. 4.5.5. Вплив нативного та обробленого протеїназою К бактеріоцину *E. italicus* ОНУ547 на утворення біоплівки *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157

Примітка: * - статистично достовірно ($p < 0,05$);

■ - Негативний контроль, ■ - протеїназа К, ■ - очищений бактеріоцин, ■ - очищений бактеріоцин, оброблений протеїназою К

Такий ефект спостерігався і у випадку, коли дію бактеріоцину було перевірено на планктонних клітинах *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 (рис. 4.5.6). Дані результати підтверджують бактеріоцину природу інгібування росту планктонних клітин даного індикаторного штаму (Мерліч та ін. 2016).

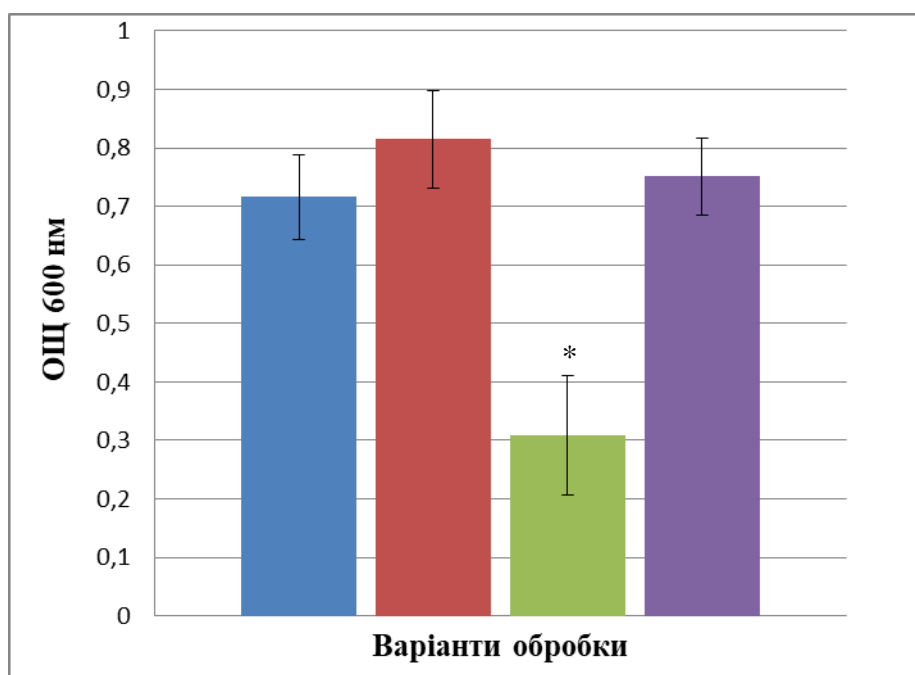


Рис. 4.5.6. Вплив нативного та обробленого протеїназою К бактеріоцину *E. italicus* ОНУ547 на ріст планктонних клітин *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157

Примітка: * - статистично достовірно ($p < 0,05$);

■ - Негативний контроль, ■ - протеїназа К, ■ - очищений бактеріоцин, ■ - очищений бактеріоцин, оброблений протеїназою К

Значний інтерес викликають механізми інгібування утворення біоплівки *P. aeruginosa* PAO1 бактеріоцином *E. italicus* ОНУ547. На жаль, про механізми впливу бактеріоцинів на білоплівкоутворення *P. aeruginosa* відомо мало. Враховуючи дані літератури по впливу бактеріоцинів на утворення біоплівки *S. aureus* (Pimentel-Filho Nde J et al. 2014) можна зробити припущення про те, що зміни адгезивних властивостей бактерій під впливом бактеріоцину та його втручання в процеси кворум сенсингу могли бути одним з можливих механізмів інгібування утворення біоплівки і *P. aeruginosa* PAO1 у наших експериментах.

Отже, у результаті проведених досліджень із ферментованих продуктів України і Таїланду виділено штам продуцент бактеріоциноподібних сполук. Білкова природа його була підтверджена за допомогою обробки протеїназою К. Продуцент бактеріоцину, ізольований із тайської ферментованої капусти, на основі тинкторіальних, морфологічних, культуральних, фізіолого-біохімічних властивостей

та секвенування гена 16S рРНК ідентифіковано як *E. italicus*. Встановлено, що бактерії штаму *E. italicus* ОНУ547 продукують високогідрофобний, катіонний бактеріоцин з молекулярною масою 2-3 кДа. В результаті комбінації методів гідрофобної та іонообмінної хроматографії з використанням картриджу C₈ та колонки HiPrep QXL з системою АКТА Explorer бактеріоцин частково очищено до активності 5120 ВО/мл. Встановлено, що активність бактеріоцину з НОР збільшується після нагрівання при 80 °С, 100 °С та 121 °С, а частково очищений бактеріоцин не змінює свою активність після впливу високих температур. Досліджуваний бактеріоцин пригнічує утворення біоплівки бактеріями штамів *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 та *P. aeruginosa* PAO1. Інгібувальний вплив бактеріоцину на ріст та утворення біоплівки *L. sakei*, а також на ріст *B. thermosphacta* та *L. ivanovii* свідчить про перспективу використання його в харчовій промисловості для захисту продуктів харчування від псування.

РОЗДІЛ 5

УТВОРЕННЯ БІОПЛІВКИ БАКТЕРІЯМИ *E. ITALICUS* ОНУ547 НА ПОВЕРХНЯХ РОСЛИН

Адгезія та утворення лактобактеріями біоплівки на поверхнях рослин разом з продукцією антимікробних метаболітів може забезпечити їм конкурентні переваги перед фітопатогенними мікроорганізмами та сприяти стимулюванню росту рослин (Shrestha et al. 2014; Kachouri et al. 2016). У зв'язку з цим, вивчення здатності МКБ до формування біоплівок на рослинах може дозволити відібрати перспективні штами для використання їх в сільському господарстві. Вивчення здатності до утворення біоплівки бактерій виду *E. italicus* представляє також значний теоретичний інтерес, оскільки подібні дослідження до цього часу не проводились.

У наших експериментах вивчено здатність до утворення полівидових біоплівок на поверхнях рослин бактеріями штамів *E. italicus* ОНУ547 разом з *L. plantarum* ОНУ12 та ОНУ311. Указані штами лактобацил були обраними нами серед інших для дослідження у зв'язку з їх високою пригнічувальною активністю по відношенню до фітопатогенів завдяки органічним кислотам, показану в наших роботах (Limanska et al. 2013; Мерліч та ін. 2014; Мерліч та Ліманська 2016; Ліманська та ін. 2015; Limanska et al. 2015a; Limanska et al. 2015b; Limanska et al. 2016; Ліманська та ін. 2017). Ступінь утворення біоплівок на поверхнях проростків рослин крес-салату визначали згідно з Галкіним та ін. (2012).

У результаті проведених досліджень виявлено високу здатність МКБ усіх трьох штамів, а також їх комплексів, до формування біоплівки на поверхні листків крес-салату. Утворені біоплівки були найвищого ступеня сформованості (++++), тобто не містили розривів та мали значну товщину. Здатність *E. italicus* до формування біоплівки на поверхні листків крес-салату нами було виявлено вперше (Мерліч 2018).

Що стосується ступеня сформованості біоплівки на поверхні стебел та корінців крес-салату, то він відрізнявся в залежності від перевіреного штаму бактерій, їх виду та комплексу. Дійсно, тоді як бактерії штаму *E. italicus* ОНУ547 не формували біоплівки на стеблах крес-салату, лактобацили обох штамів утворювали

біоплівку найвищого ступеня сформованості на цих частинах рослин (табл. 5.1) (Мерліч 2018).

Таблиця 5.1.

Ступінь сформованості біоплівки МКБ на поверхні стебел крес-салату

МКБ та їх суміші	Ступінь сформованості біоплівки
<i>E. italicus</i> ОНУ547	-
<i>L. plantarum</i> ОНУ12	++++
<i>L. plantarum</i> ОНУ311	++++
<i>E. italicus</i> ОНУ547, <i>L. plantarum</i> ОНУ12	++
<i>E. italicus</i> ОНУ547, <i>L. plantarum</i> ОНУ311	+++
<i>E. italicus</i> ОНУ547, <i>L. plantarum</i> ОНУ12, <i>L. plantarum</i> ОНУ311	++
<i>L. plantarum</i> ОНУ12, <i>L. plantarum</i> ОНУ311	+

Найбільша здатність до утворення плівкової біоплівки серед перевірених комплексів була характерною для суміші бактерій *E. italicus* ОНУ547 та *L. plantarum* ОНУ311, що утворювали біоплівку високого ступеня сформованості, в якій були розриви. Решта сумішей проявили нижчу здатність до формування біоплівки на поверхні стебел проростків крес-салату. Нами відмічено зменшення здатності до утворення біоплівки комплексом бактерій штамів *L. plantarum* порівняно з окремими штамми, що, ймовірно, пов'язано з можливими конкурентними взаємодіями між ними (Мерліч 2018).

Крім надземних частин проростків крес-салату, нами визначено здатність МКБ досліджених штамів до утворення біоплівки на поверхні коренів. У результаті проведених досліджень вперше встановлено, що бактерії *E. italicus* ОНУ547 утворюють біоплівки середнього рівня сформованості на коренях проростків крес-салату (рис. 5.1, табл. 5.2) (Мерліч та ін. 2017с).

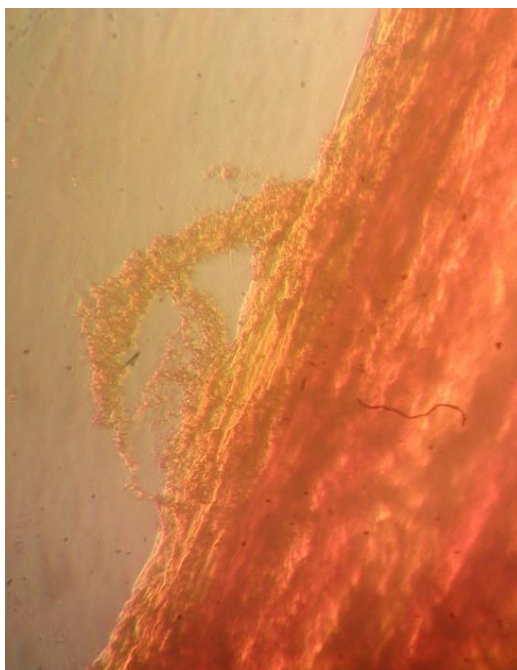


Рис. 5.1. Біоплівка бактерій штаму *E. italicus* ОНУ547 на коренях проростків крес-салату

Крім надземних частин проростків крес-салату, як і в випадку *E. italicus* ОНУ547 нами визначено здатність лактобацил до утворення біоплівок на поверхні коренів. В результаті, на відміну від надземних частин, ступінь біоплівкоутворення на коренях був меншим та залежав від штаму *L. plantarum*. Дійсно, бактерії штаму *L. plantarum* ОНУ12 утворювали на поверхні коренів проростків крес-салату добре сформовані біоплівки, тоді як *L. plantarum* ОНУ311 (табл. 5.2) утворювали біоплівку середнього ступеня сформованості (Галкін та ін. 2017). Показано також здатність бактерій виду *L. plantarum* до утворення біоплівок на поверхнях рослини на моделі оливок. Автори зробили висновок, що інгібувальна активність *L. plantarum* проти грибів була обумовлена здатністю до утворення біоплівки (Kachouri et al. 2016).

Суміші бактерій *E. italicus* ОНУ547 та *L. plantarum* ОНУ12 і *L. plantarum* ОНУ311 в нашому дослідженні також виявили здатність до утворення біоплівок, що було показано на моделях коренях проростків крес-салату (табл. 5.2) (Мерліч та ін. 2017с).

Таблиця 5.2.

**Ступінь сформованості біоплівки МКБ на поверхні коренів проростків
крес-салату**

МКБ та їх суміші	Ступінь сформованості біоплівки
<i>E. italicus</i> ОНУ547	+++
<i>L. plantarum</i> ОНУ12	+++
<i>L. plantarum</i> ОНУ311	++
<i>E. italicus</i> ОНУ547 + <i>L. plantarum</i> ОНУ12	+++
<i>E. italicus</i> ОНУ547 + <i>L. plantarum</i> ОНУ311	++++
<i>E. italicus</i> ОНУ547 + <i>L. plantarum</i> ОНУ12 + <i>L. plantarum</i> ОНУ311	++++
<i>L. plantarum</i> ОНУ12 + <i>L. plantarum</i> ОНУ311	+++

Найвищу здатність до утворення біоплівок на обраній моделі рослин продемонстрували суміші бактерій *E. italicus* ОНУ547 та *L. plantarum* ОНУ311 (рис. 5.2) та *E. italicus* ОНУ547, *L. plantarum* ОНУ12 і *L. plantarum* ОНУ311 (Мерліч та ін. 2017с). Як видно з представлених даних, комплекс ентерококу з *L. plantarum* ОНУ311 проявив кращу здатність до утворення біоплівки ніж його суміш з *L. plantarum* ОНУ12, як на поверхні стебел, так і на поверхні коренів. Можливо, ентерокок вступає у симбіотичну взаємодію з бактеріями штаму *L. plantarum* ОНУ311, тоді як до бактерій *L. plantarum* ОНУ12 були більш характерні конкурентний характер відносин. У літературних джерелах є повідомлення про здатність *L. plantarum* до утворення біоплівок на поверхнях рослин (Kachouri et al. 2016; Галкін та ін. 2012). Суміш бактерій штамів *L. plantarum* ОНУ12 і *L. plantarum* ОНУ311 без *E. italicus* ОНУ547 проявила дещо меншу здатність до утворення полівидових біоплівок. Це свідчить про те, що додавання бактерій *E. italicus* ОНУ547 до лактобацил підвищує ступінь сформованості біоплівки.

Знання про механізм формування біоплівок молочнокислими бактеріями є практично важливими, однак, мало що відомо про це. На моделі *L. plantarum* пока

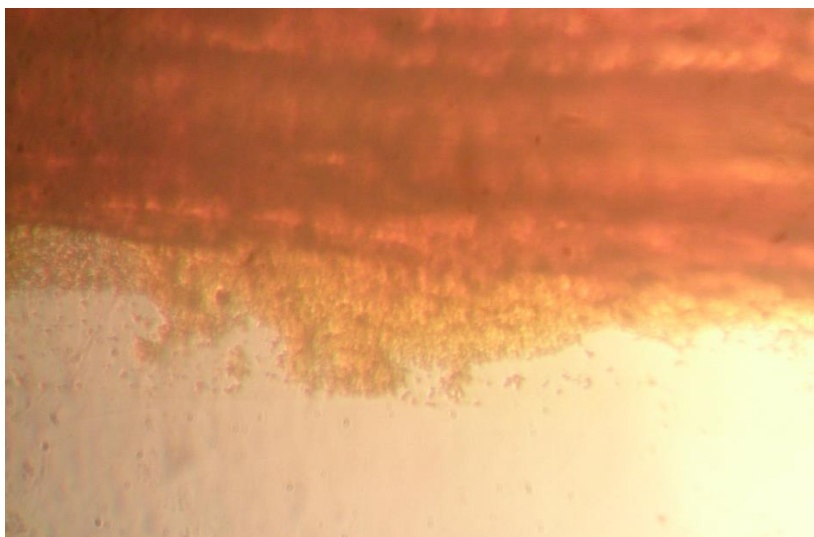


Рис. 5.2. Біоплівка, утворена бактеріями *E. italicus* ОНУ547 і *L. plantarum* ОНУ311, на поверхні коренів крес-салату

зано, що участь у цьому процесі беруть електрон-донорні, Ван дер Ваальсові, кисло-лужні взаємодії та гідрофобні зв'язки (Kachouri et al. 2016), а також було встановлено, що клітини бактерій цього виду мають електрон-донорні та лужні властивості (Dias et al. 2013b). Утворення біоплівок бактеріями виду *L. plantarum* на поверхні рослин була показана в роботі вітчизняних вчених, де авторами зроблено висновок про те, що компонентами бактеріальних клітин, які відіграють роль у формуванні біоплівки на коренях рослин були протеїни S-шару, поліцукриди та тейхоєві кислоти, а головна роль в цьому процесі належала протеїнам S-шару (Галкін та ін. 2012). Подібні хімічні речовини могли забезпечувати утворення біоплівки МКБ на поверхні коренів крес-салату і в наших експериментах.

Таким чином, показано, що бактерії штаму *E. italicus* ОНУ547 утворюють біоплівку високого ступеня сформованості на коренях рослин, а суміш ентерокока з лактобацилами у більшості випадків виявили високу здатність до утворення полівидової біоплівки.

Можна припустити, що використання бактерій штамів МКБ з високою здатністю до формування біоплівки на поверхнях рослин, в тому числі на коренях, може бути перспективним для створення біологічних препаратів для захисту рослин від фітопатогенів.

РОЗДІЛ 6

АНТИМІКРОБНА АКТИВНІСТЬ *E. ITALICUS* ОНУ547 У ДОСЛІДАХ *IN VIVO*

Для того, щоб визначити можливість застосування досліджуваних молочнокислих бактерій для розробки засобів захисту рослин від фітопатогенних мікроорганізмів було перевірено антагоністичну активність бактерій штаму *E. italicus* ОНУ547 та їх сумішей з *L. plantarum* ОНУ12 і *L. plantarum* ОНУ311 проти фітопатогенних бактерій *R. radiobacter* С58 та *E. carotovora* ZM1у дослідях *in vivo*.

У результаті проведених досліджень показано, що досліджений ентерокок *in vivo* проявив антагоністичну активність проти обох фітопатогенів. Так, бактерії штаму *E. italicus* ОНУ547 пригнічували ріст фітопатогена *R. radiobacter* С58 на 33,3% (Мерліч та ін. 2017с; Ліманська та ін. 2018).

Високу антагоністичну активність показала також суміш бактерій штамів *L. plantarum* ОНУ12 та *L. plantarum* ОНУ311 (рис. 6.1), яка інгібувала ріст *R. radiobacter* С58 на 66,7%. Суміш бактерій усіх трьох штамів МКБ пригнічувала ріст цих бактерій на 77,7% (Мерліч та ін. 2017с; Ліманська та ін. 2018).

Додавання бактерій *E. italicus* ОНУ547 до лактобацил сприяло збільшенню прояву антагоністичної активності щодо *R. radiobacter* С58 на 11%. Суміш бактерій штамів *E. italicus* ОНУ547 та *L. plantarum* ОНУ12 пригнічувала ріст фітопатогена на 44,7%, а *E. italicus* ОНУ547 та *L. plantarum* ОНУ311 – на 22,3% (Мерліч та ін. 2017с).

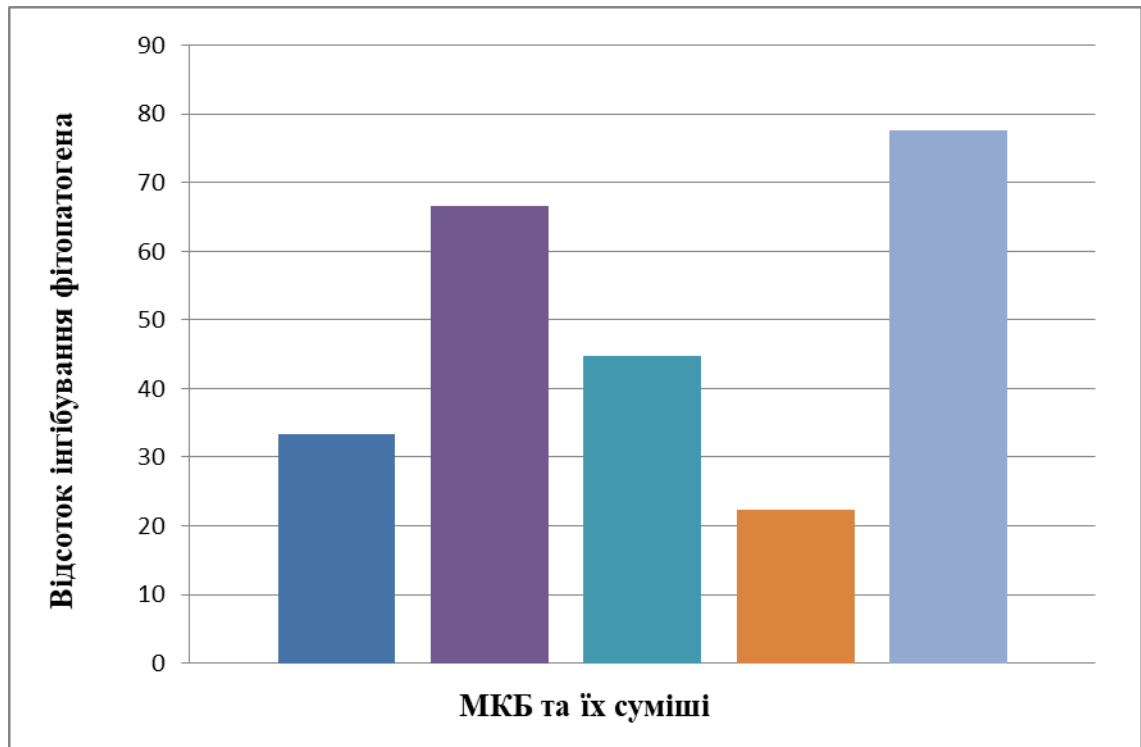


Рис. 6.1. Антимікробна активність бактерій штамів *E. italicus* OHY547 та сумішей МКБ щодо *R. radiobacter* C58 на експлантах моркви

Примітка: ■ *E. italicus* OHY547, ■ *L. plantarum* OHY12 + OHY311, ■ *E. italicus* OHY547 + *L. plantarum* OHY12, ■ *E. italicus* OHY547 + *L. plantarum* OHY311, ■ *E. italicus* OHY547 + *L. plantarum* OHY12 + *L. plantarum* OHY311

Показано, що бактерії штаму *E. italicus* OHY547 інгібують ріст *E. carotovora* ZM1 на 24,8% (рис. 6.2; 6.3). Суміші бактерій штамів *E. italicus* OHY547, *L. plantarum* OHY311 та трьох штамів МКБ, спричинили 33,3% інгібування (Мерліч та ін. 2017с; Ліманська та ін. 2018).

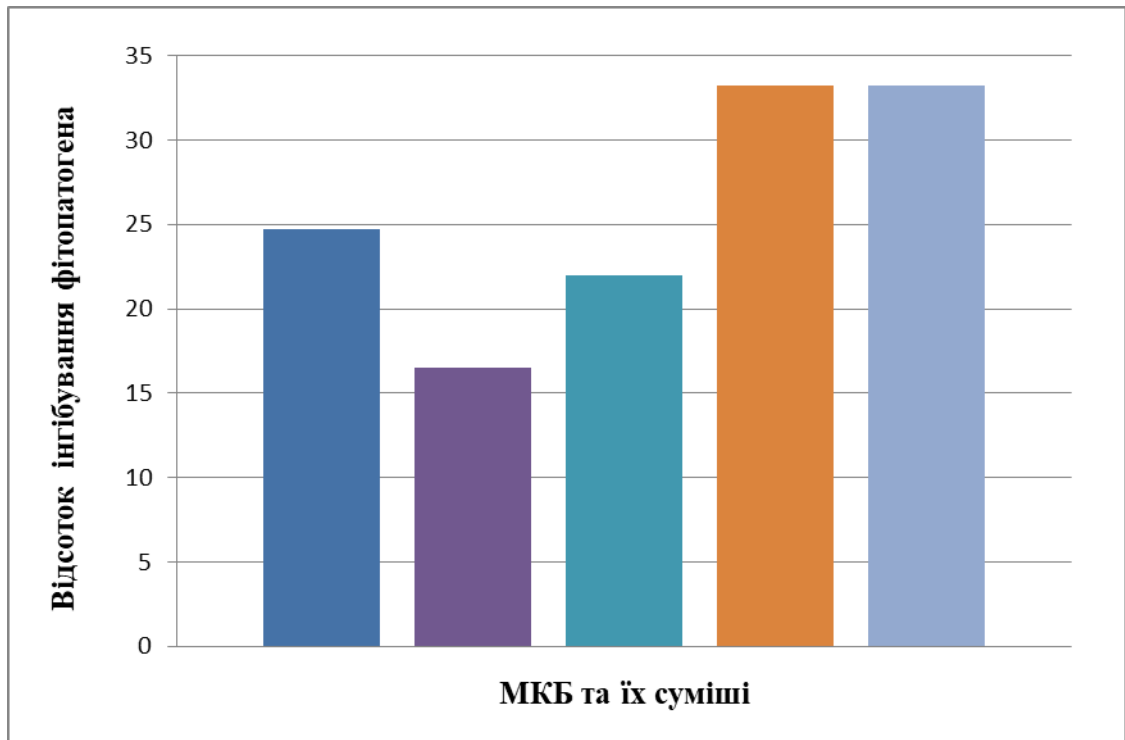


Рис. 6.2. Антимікробна активність бактерій штаму *E. italicus* OHU547 та сумішей МКБ щодо *E. carotovora* ZM1 на експлантах моркви

Примітка: ■ *E. italicus* OHU547, ■ *L. plantarum* OHU12 + OHU311, ■ *E. italicus* OHU547 + *L. plantarum* OHU12, ■ *E. italicus* OHU547 + *L. plantarum* OHU311, ■ *E. italicus* OHU547 + *L. plantarum* OHU12 + *L. plantarum* OHU311

Суміші бактерій *E. italicus* OHU547 і *L. plantarum* OHU12 та *L. plantarum* OHU12 і *L. plantarum* OHU311 інгібували ріст *E. carotovora* ZM1 на 22 та 16,5%, відповідно. Таким чином, додавання до бактерій штаму *E. italicus* OHU547 бактерій *L. plantarum* OHU12 та OHU311 сприяло підвищенню інгібувальної активності на 5,5 та 16,8% (Мерліч та ін. 2017с).



E. italicus ONU547 +
E. carotovora ZM1

MRS +
E. carotovora ZM1

Рис. 6.3. Створення штучного інфекційного фону в лабораторних умовах

Пригнічувальну активність бактерій виду *L. plantarum* щодо фітопатогенів на коренеплодах моркви було показано в наукових роботах (Сергеєва та ін. 2012; Сергеєва та ін. 2016) та наших публікаціях (Мерліч та Ліманська 2016; Limanska et al. 2015b). Інгібувальну активність лактобацил з бактеріями виду *E. italicus* проти фітопатогенів *in vivo* показано вперше. Крім того, це перше повідомлення про антагоністичну активність МКБ виду *E. italicus* проти фітопатогенних бактерій *E. carotovora* та *R. radiobacter*, як і проти фітопатогенів взагалі (Мерліч та ін. 2017с).

За результатами проведених досліджень комплекс продуктів метаболізму бактерій штаму *E. italicus* ONU547, включаючи досліджений ентероцин, не проявили інгібувальної активності проти фітопатогенних бактерій *in vitro*. На відміну від продуктів метаболізму, протестованих *in vitro*, бактерії штаму *E. italicus* ONU547 у досліджах *in vivo* проявили антагоністичну активність проти *R. radiobacter* та *E. carotovora*, як окремо, так і в сумішах з бактеріями штамів *L. plantarum*. Так, інгібувальна активність цих бактерій проти *R. radiobacter* C58 та *E. carotovora* ZM1 на експлантах моркви складала 33,3% та 24,8%, відповідно. Суміші ентерокока з лактобацилами, у більшості випадків, проявили вищу антагоністичну активність ніж ентерокок окремо.

Отже, можна припустити, що антагоністичні властивості бактерій штаму *E.*

italicus ОНУ547 та його суміші з *L. plantarum* ОНУ12 та ОНУ311 обумовлені поєднанням таких властивостей як здатність їх до утворення біоплівки і колонізації поверхні рослин та продукцією органічних кислот.

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження антимікробної активності лактобактерій є цікавим з фундаментальної та прикладної точок зору. До метаболітів МКБ з пригнічувальною активністю належать органічні кислоти, перекис водню, сідерофори, біосурфактанти, діацетил, оцтовий альдегід, етанол, бактеріоцини, бактеріоциноподібні сполуки (Visser and Holzapfel 1992; Atrih et al. 2001; Audisio et al. 2005; Gupta et al. 2010; Aguilar and Klotz 2010; Klewicka and Libudzisz 2004; Shrestha et al. 2014; Rodridues et al. 2004; Broberg et al. 2007; Oberman et al. 1982). Бактеріоцини привертають особливу увагу як можлива альтернатива або доповнення традиційним антибіотикам та хімічним консервантам (Perez et al. 2014).

З метою пошуку продуцента бактеріоцинів серед ізолятів МКБ з різних географічних регіонів нами виділено нові ізоляти лактобактерій з ферментованих продуктів домашнього та цехового виробництва рослинного та тваринного походження України і Таїланду, а також досліджені штами *L. plantarum* з України та Франції.

Показано, що представники виду *L. plantarum* зустрічалися у відсотковому складі 58,3% у суслі з ягід винограду України та 38,2% - Франції від загальної кількості виділених ізолятів лактобацил. Вивчення генетичної різноманітності штамів *L. plantarum*, виділених із виноградного сусли, відібраного на насадженнях України, за результатами аналізу профілів RAPD-ПЛР з праймером M13 показало, що вони поділяються на чотири кластери. Продемонстровано відсутність зв'язку в більшості кластерів побудованого філогенетичного дерева між походженням ізолятів та їх генетичними профілями.

На бактеріоциногенну активність проти індикаторного мікроорганізму *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 було протестовано 108 штамів МКБ, включаючи 78 виділених штамів та 30 штамів бактерій з колекції кафедри мікробіології вірусології та біотехнології. Із усіх протестованих лише один ізолят МКБ зі 108 проявив активність НОР проти індикаторного мікроорганізму, що дозволило розглядати його як продуцента бактеріоцину. Білкову природу антагоністичної сполуки підтверджено

шляхом обробки її протеолітичним ензимом. Після обробки протеїназою К протягом трьох годин антибактеріальна активність зникала, що вказувало на білкову природу сполуки з антибактеріальною активністю.

Продуцента бактеріоцину ідентифіковано за результатами вивчення тинкторіальних, морфологічних, культуральних, фізіолого-біохімічних властивостей та секвенування гену 16S рРНК як *Enterococcus italicus*. Бактерії цього виду було вперше виділено з сирів Італії (Fortina et al. 2004). В літературі повідомлено також про виділення *E. italicus* зі здатністю до синтезу бактеріоцинів з туніського молока (Gaaloul et al. 2014). У нашій роботі бактерії цього виду виділено з ферментованої тайської капусти. Це перше повідомлення про виділення штаму *E. italicus*, здатного продукувати бактеріоцин, з рослинного матеріалу.

Крім бактерій штаму-індикатора *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 ізольований нами штам *E. italicus* ОНУ547 проявив інгібувальну активність також проти *B. thermosphacta* DSMZ 20171 та *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* 20750. Відомо, що бактерії *L. sakei* спричиняють псування м'ясних продуктів (Kalschne et al. 2015; Dias et al. 2013a; Cocolin et al. 2004), а *L. ivanovii* є патогеном тварин та умовним патогеном людини (Vázquez-Boland et al. 2001; Guillet et al. 2010).

Активність бактеріоцину *E. italicus* проти *L. ivanovii* узгоджується з результатами Gaaloul et al. (2014), однак, активність бактеріоцину бактерій цього виду МКБ проти псувних бактерій *B. thermosphacta* в нашій роботі встановлено вперше. Бактеріоцин виявився неактивним проти грамнегативних індикаторних мікроорганізмів, використаних у нашій роботі, що узгоджується з даними літератури (Gaaloul et al. 2014; Joosten et al. 1996; Eguchi et al. 2001; Floriano et al. 1998; Yamamoto et al. 2003; Audisio et al. 2005; Dezwaan et al. 2007).

Для виділення та очищення бактеріоцину *E. italicus* ОНУ 547 використано дві схеми. Перша з них, що включала такі біохімічні методи як преципітація сульфатом амонію, катіонообмінна хроматографія з картриджем Sep-Pak Vac Accell Plus CM, гідрофобна хроматографія з картриджем Sep-Pak Vac C₈ та ОФ-ВЕРХ з колонкою C₈, призвела до втрати більшості бактеріоцину, активність якого складала 20 ВО/мл після використання вищеназваних методів. Втрату бактеріоцину можна пояснити

його високими гідрофобними властивостями, як було показано з застосуванням гідрофобної хроматографії, що призводить до незворотного зв'язування при проведенні ОФ-ВЕРХ (Dezwaan et al. 2007).

На відміну від хроматографічних методів першої схеми очищення, використання другої схеми, яка включала гідрофобну хроматографію з картриджем C_8 та іонообмінну хроматографію з колонкою HiPrep QXL та системою АКТА Explorer, дозволило отримати фракції бактеріоцину з максимальною активністю, яка становила 5120 ВО/мл.

Протягом процедур концентрування та очищення досліджений бактеріоцин проявив специфічність до аніонного та гідрофобного картриджив при проведенні катіонообмінної та гідрофобної хроматографії, відповідно, що вказує на катіонну природу та гідрофобність цієї антимікробної сполуки. Виявлення двох піків на електрофореграмі ОФ-ВЕРХ, фракції яких проявили інгібувальну активність проти індикаторного мікроорганізму *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157, може свідчити про продукцію *E. italicus* ОНУ547 двох бактеріоцинів, що планується підтвердити у подальших дослідженнях більш детальної характеристики цього бактеріоцину.

Показано, що нагрівання при 80 °С протягом 15 та 30 хв так само, як і кип'ятіння впродовж 15 хв, збільшує активність бактеріоцину з НОР у чотири рази порівняно з непрогрітою НОР до 1280 ВО/мл, а у випадку автоклавування при одній атм протягом 15 хв активність була збільшена у два рази та складала 640 ВО/мл. Для з'ясування природи такого ефекту необхідні подальші дослідження. Відомо, що гідрофобні зв'язки ослаблюються під впливом нагрівання (Остерман 1985). Отже, збільшення пригнічувальної активності неочищеного бактеріоцину могло бути спричиненим покращенням його розчинності в результаті зменшення гідрофобності під впливом нагрівання. Ймовірно, при зменшенні гідрофобності молекули бактеріоцину, що формували агрегати у водному розчині роз'єднувалися та це сприяло кращій дифузії цієї сполуки у агар та збільшенню її пригнічувальної активності.

На відміну від неочищеного бактеріоцину, нагрівання при 80 °С протягом 15 хв та 30 хв не впливало на активність фракції ЧОБ, отриманої після гідрофобної та

іонообмінної хроматографії, активність якої складала як у випадку контролю, так і у випадку прогрітих проб 5120 ВО/мл.

Молекулярна маса ентероцину *E. italicus* ОНУ547, визначена за допомогою Tricine-SDS-PAGE, складала 2-3 кДа. З літературних даних відомо про синтез бактеріями виду *E. italicus* ентероцину А та ентероцину В, молекулярна маса яких складає біля 5 кДа (Gaaloul et al. 2014; Aumerich et al. 1996; Casaus et al. 1997). Отже, в нашому випадку отримані результати можуть вказувати на можливість продукції бактеріями цього штаму бактеріоцинів нового типу. Подібним за молекулярною масою до бактеріоцину *E. italicus* ОНУ547 є бактеріоцин штаму *E. faecalis* NKR-4-1 ентероцин W, що складається із двох компонентів, маса яких становить 3256,5 та 2728,6 Да (Sawa et al. 2012). У подальшому планується проведення робіт з амінокислотного секвенування ентероцину *E. italicus* ОНУ547 та визначенню його молекулярної маси за допомогою мас спектрометрії.

Виділений бактеріоцин інгібує утворення біоплівки індикаторами *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 і *P. aeruginosa* PAO1 на 52,5% та 48,0%, відповідно. Бактеріоцин з НОР не впливає на утворення біоплівок *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157, однак, пригнічує біоплівкоутворення *P. aeruginosa* PAO1 на 41,4%. Незважаючи на наявність повідомлень про інгібування біоплівок за допомогою бактеріоцинів (Al-Mathkhury et al. 2011; Wang and Liu 2016; Pimentel-Filho Nde J et al. 2014; Salman et al. 2014), в нашій роботі вперше показано пригнічення біоплівкоутворення бактеріоцином бактерій виду *E. italicus*. Крім біоплівок, досліджений концентрований ентероцин також інгібує ріст планктонних клітин *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 на 20,7%, а *P. aeruginosa* PAO1 – концентрований бактеріоцин, розведений у 100 разів та НОР, розведений у 10 разів – на 36,1% та 27,6%. Бактеріоцинну природу інгібування біоплівок та планктонних клітин підтверджено за допомогою обробки протеїназою К на моделі *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157. Інгібування біоплівкоутворення та планктонних клітин фітопатогеном *R. radiobacter* C58 дослідженим бактеріоцином не спостерігалось.

Однією з властивостей МКБ, яка може забезпечувати їх антагоністичну активність є здатність бактерій до адгезії та утворення біоплівок (Kachouri et al.

2016). Нами вивчено формування біоплівки бактерій *E. italicus* та *L. plantarum* та їх комплексів на поверхнях крес-салату. Показано, що бактерії штамів *E. italicus* ОНУ547, *L. plantarum* ОНУ12 та *L. plantarum* ОНУ311 здатні до утворення біоплівки на поверхнях проростків крес-салату. Ентерококи утворювали на поверхні коренів крес-салату біоплівки, товщина яких була середнього рівня. Отже, нами вперше показано здатність МКБ *E. italicus* до біоплівкоутворення на поверхні рослин. На відміну від *E. italicus* ОНУ547, бактерії штамів *L. plantarum* ОНУ12 та ОНУ311 також показали здатність до формування біоплівки на поверхні стебел рослин. Крім того, нами показано здатність до утворення біоплівки комплексом бактерій *E. italicus* та *L. plantarum* на поверхні коренів крес-салату.

Бактерії досліджуваного штаму МКБ інгібують ріст фітопатогенних бактерій *R. radiobacter* C58 та *E. carotovora* ZM1 *in vivo* на 33,3 та 24,8%, відповідно. Ймовірно, антагоністична активність *in vivo* забезпечується високими адгезивними властивостями та/або здатністю до конкуренції за поживні речовини. Це перше повідомлення про інгібувальну активність бактерій виду *E. italicus* до фітопатогенних бактерій.

Вперше показано інгібувальну активність до фітопатогенів комплексів бактерій штамів *E. italicus* ОНУ547, *L. plantarum* ОНУ12 і *L. plantarum* ОНУ311 *in vivo*. Серед комплексів бактерій найвищу антагоністичну активність *in vivo* проти фітопатогену *R. radiobacter* C58 проявив консорціум усіх трьох штамів МКБ: *E. italicus* ОНУ547, *L. plantarum* ОНУ12 та *L. plantarum* ОНУ311, який інгібав цей фітопатоген на 77,7%. Проти фітопатогену *E. carotovora* ZM1 найефективнішими серед досліджених виявилися консорціуми бактерій *E. italicus* ОНУ547, *L. plantarum* ОНУ12 та *L. plantarum* ОНУ311, а також *E. italicus* ОНУ547 і *L. plantarum* ОНУ311, які викликали 33,3% інгібування фітопатогена.

Отже, на основі отриманих результатів можна припустити, що бактеріоцин *E. italicus* ОНУ547 завдяки своїм інгібувальним властивостям та стійкості до високих температур може бути перспективним для подальших досліджень для використання його як харчового консерванта. Штами МКБ та їх консорціуми, які проявляють

антагоністичну активність проти фітопатогенних мікроорганізмів та здатність до утворення біоплівки на поверхнях рослин, можуть бути рекомендовані для подальших досліджень з метою створення біологічних препаратів захисту рослин.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі досліджено ізоляти молочнокислих бактерій, виділені з традиційних ферментованих продуктів, відібраних на ринках України, Франції та Таїланду, ізольовано та вивчено морфолого-культуральні, фізіолого-біохімічні, молекулярно-біологічні ознаки та біохімічний склад бактерій штаму *E. italicus* ОНУ547 продуцента бактеріоцину, очищено та вивчено властивості його бактеріоцину.

1. Показано, що серед ізолятів лактобацил, отриманих із виноградного суслу України та Франції представники *L. plantarum* зустрічались в 58,3% та 38,2%, відповідно. Вивчення різноманітності штамів *L. plantarum*, ізольованих із виноградного суслу з ягід винограду, відібраного на насадженнях України, за результатами аналізу профілів RAPD-ПЛР показало відсутність зв'язку між походженням ізолятів та їх генетичними профілями.
2. Вперше серед мікробіоти ферментованих рослин виявлено штам *E. italicus* продуцент бактеріоцину. Встановлено, що бактеріоцин штаму *E. italicus* ОНУ547 пригнічує ріст бактерій *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157, *Brochothrix thermosphacta* DSMZ 20171 і *Listeria ivanovii* subsp. *ivanovii* 20750. Жоден із досліджених штамів *L. plantarum* не виявив здатності до продукції бактеріоцину.
3. Показано, що у складі бактерій *E. italicus* ОНУ547 переважають L-аргінін (16,58%), гліцин (16,47%) та L-глутамова кислота (12,68%), серед цукрів у найбільшій кількості присутня глюкоза (87,77%), трапляється галактоза (5,27%), арабіноза (3,38%), маноза (1,29%), ксилоза (1,20%) та рамноза (1,09%), серед органічних кислот у культуральній рідині домінує оцтова кислота (87,68%).
4. Визначено спектр жирних кислот та встановлено, що насичені жирні кислоти бактерій штаму *E. italicus* ОНУ547 складають 31,7% від загальної кількості екстрагованих, тоді як ненасичених – 68,3%, серед насичених жирних кислот виявлено додеканову ($C_{12:0}$), тетрадеканову ($C_{14:0}$), гексадеканову ($C_{16:0}$), гептадеканову ($C_{17:0}$), октадеканову $C_{18:0}$ та циклопропанову ($C_{19:0}$ цикло w8c) кислоти, тоді як серед ненасичених - суміші гексадеценоних ($C_{16:1}w7c/C_{16:1}w6c$) і октадеценоних кислот ($C_{18:1}w7c/C_{18:1}w6c$) та ейкозенова кислота ($C_{20:1}w7c$).

5. Досліджений бактеріоцин виявив катіонні та гідрофобні властивості, при електрофорезі він розділяється на дві складові з молекулярною масою 2 та 3 кДа, що може вказувати на продукцію штамом *E. italicus* ОНУ547 двох бактеріоцинів.
6. Встановлено, що за впливу високих температур (до 121 °С) активність неочищеного бактеріоцину зростає у два-чотири рази, в той час як очищений бактеріоцин не змінює своєї активності після температурної обробки. Бактеріоцин пригнічує утворення біоплівки бактеріями індикаторами *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 на 52,5% та *P. aeruginosa* PAO1 - на 48,0%.
7. Вперше показано, що бактерії штаму *E. italicus* ОНУ547 здатні утворювати біоплівку на поверхнях проростків крес-салату, встановлено їх здатність до утворення біоплівки комплексу бактерій *E. italicus* та *L. plantarum* на поверхні коренів крес-салату.
8. Бактерії добової культури *E. italicus* ОНУ547 *in vivo* пригнічують ріст *R. radiobacter* C58 на 33,3% та *Erwinia carotovora* ZM1 на 24,8% на моделі експлантів моркви.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Василюк ОМ, Коваленко НК, Гармашева ІЛ (2014а) Антагоністичні властивості штамів *Lactobacillus plantarum*, ізольованих із традиційних ферментованих продуктів України. Мікробіол журн 76(3):24-30.
2. Василюк ОМ, Коваленко НК, Гармашева ІЛ (2014b) Фізіолого-біохімічні властивості штамів *Lactobacillus plantarum*, ізольованих із традиційних ферментованих продуктів різних регіонів України. Мікробіол журн 76(5):2-8.
3. Галкін МБ, Ліманська НВ, Філіпова, ТО та ін (2012) Формування біоплівки бактеріями *Lactobacillus plantarum* на коренях рослин *Lepidium sativum* L. Мікробіологія і біотехнологія 3:34-43.
4. Галкін МБ, Ліманська НВ, Мерліч АГ та ін. (2017) Формування біоплівок *Lactobacillus plantarum* на рослинних поверхнях та їх захисні властивості щодо інфекції *Agrobacterium tumefaciens*. В: Тези доповідей XV з'їзду товариства мікробіологів України ім СМ Виноградського Одеса, 11-15 вересня 2017.
5. Гармашева ІЛ, Коваленко НК (2011) Энтероцины – разнообразие, свойства и практическое применение. Мікробіол журн 73 (5):61-70.
6. Гармашева ІЛ, Коваленко НК, Зелена ЛБ (2009) Видова ідентифікація ентерококів. Мікробіол журн 71(2):3-12.
7. Гармашева ІЛ, Василюк ОМ, Коваленко НК та ін (2015) Дослідження природи антагоністичної дії штамів *Lactobacillus plantarum* щодо умовно-патогенних та фітопатогенних мікроорганізмів. Мікробіологія і біотехнологія 2:49-58.
8. Гармашева ІЛ, Коваленко НК, Підгорський ВС та ін (2016) Взаємодія клітин штаму *Lactobacillus plantarum* 337Д УКМ В-2627 з глинистими мінералами *in vitro*. Мікробіол журн 78(4):11-24.
9. Гармашева ІЛ, Коваленко НК, Олещенко ЛТ (2018) Стійкість до антибіотиків, декарбоксилазна та гемолітична активності ентерококів, ізольованих із традиційних кисломолочних продуктів. Мікробіол журн 80(1):3-14. doi: <https://doi.org/10.15407/microbiolj80.01.003>.
10. Єлинська НО, Кур'ята НВ, Філіпова ТО та ін (2003) Вплив лактобацил на функціональну активність макрофагів та реакцію гіперчутливості

сповільненого типу у мишей. Мікробіол журн 65(4):23-28.

11. Квасников ЕИ, Нестеренко ОА (1975) Молочнокислые бактерии и пути их использования. Наука, Москва.
12. Коваленко НК, Гармашева ІЛ, Лівінська ОП та ін (2017) Вплив кріоконсервації на життєдіяльність та біологічні властивості молочнокислих бактерій. Мікробіол журн 79(5):3-12.
13. Ліманська НВ, Серков СА, Сергєєва ЖЮ та ін. (2011) Виявлення штамів *Rhizobium vitis* і *R. radiobacter* методом ПЛР з використанням праймерів до різних послідовностей геному. Мікробіологія і біотехнологія 2:48-55. doi:10.18524/2307-4663.2011.2(14).92773.
14. Ліманська НВ, Мерліч АГ, Іваниця ВЮ та ін. (2015). Використання бактерій *Lactobacillus plantarum* як антагоністів фітопатогенів. В: Тези Міжнародної конференції «Інтегрований захист та карантин рослин. Перспективи розвитку в ХХІ столітті», Київ, 19-20 листопада 2015.
15. Ліманська Н, Мерліч А, Іваниця В (2016) Поширення *Lactobacillus plantarum* у ферментованому рослинному матеріалі з України і Франції. Вісник Львівського університету. Серія біологічна 74:169-174.
16. Ліманська НВ, Мерліч АГ, Жунько ІД та ін (2017) Пригнічення фітопатогенів та стимуляція росту рослин молочнокислими бактеріями *Lactobacillus plantarum*. В: Тези доповідей XV з'їзду товариства мікробіологів України ім СМ Виноградського, Одеса, 11-15 вересня 2017.
17. Ліманська НВ, Мерліч АГ, Галкін МБ та ін (2018) Розробка препаратів на основі молочнокислих бактерій для захисту рослин від фітопатогенів. В: Матеріали міжнародної науково-практичної конференції з нагоди 100-річчя Національної академії аграрних наук України «Біологічний метод захисту рослин: досягнення і перспективи», Одеса, 01-05 жовтня 2018.
18. Мерліч АГ (2018) Формування біоплівки бактеріями штаму *Enterococcus italicus* ОНУ547 та їх комплексів з *Lactobacillus plantarum* ОНУ12 та ОНУ311 на рослинах. В: Матеріали ХІІІ наукової конференції молодих вчених, присвяченої 100-річчю з дня заснування національної академії аграрних наук України

«Мікробіологія в сучасному сільськогосподарському виробництві», Чернігів, 24-25 жовтня, 2018.

19. Мерліч АГ, Ліманська НВ (2016) Антагоністична активність бактерій *Lactobacillus plantarum*, виділених з рослинних джерел України та Франції, проти фітопатогенних бактерій. Мікробіологія і Біотехнологія 4:71-85. doi: [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2016.4\(36\).86773](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2016.4(36).86773).

20. Мерліч АГ, Коротаєва НВ (2018) Склад жирних кислот бактерій штаму *Enterococcus italicus* ONU547. Мікробіологія і Біотехнологія 3:75-81. doi: [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2018.3\(43\).142237](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2018.3(43).142237).

21. Мерліч АГ, Самойленко ОЛ, Ліманська НВ (2014) Антагоністична активність *Lactobacillus plantarum* щодо фітопатогенних бактерій. В: Матеріали ІХ Міжнародної конференції молодих учених «Біологія: від молекули до біосфери», Харків, 18-20 листопада 2014.

22. Мерліч АГ, Галкін МБ, Ліманська НВ та ін (2016) Спектр активності бактеріоцину *Enterococcus italicus* W та його ефект на утворення біоплівки *Lactobacillus sakei*. В: Proceedings of International Symposium on Cell Biology jointly with 5th Ukrainian Congress for Cell Biology, Odesa, 2-6 October 2016.

23. Мерліч АГ, Жунько ІД, Ліманська НВ та ін (2017a) Антагоністична активність продуктів метаболізму бактерій *Lactobacillus plantarum* та *Enterococcus italicus* за сумісної дії проти фітопатогенних бактерій. Мікробіологія і Біотехнологія 3:45-54. doi: [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2017.3\(39\).110876](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2017.3(39).110876).

24. Мерліч АГ, Галкін МБ, Ліманська НВ та ін (2017b) Характеристика бактеріоцину *Enterococcus italicus* ONU547, виділеного з квашеної капусти Таїланду. В: Тези доповідей XV з'їзду товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського, Одеса, 11-15 вересня, 2017.

25. Мерліч АГ, Жунько ІД, Ліманська НВ та ін (2017c) Антагоністична активність проти фітопатогенних бактерій та здатність до утворення біоплівок бактерій *Enterococcus italicus* ONU547 та їх консорціумів з *Lactobacillus plantarum*.

Вісник Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна. Серія: Біологія 71-76.

26. Остерман ЛА (1985) Хроматография белков и нуклеиновых кислот. Наука, Москва.
27. Рыбалко СЛ, Ляковский ТМ, Подгорский ВС та ін. (2006) Реверсия антибиотикочувствительности молочнокислых бактерий в перевиваемых культурах лимфобластоидных клеток человека. Мікробіол журн 68(6):43-51.
28. Сергеева ЖЮ, Крылова КД, Ліманська НВ та ін (2012) Вплив *Lactobacillus plantarum* ONU87 та автолізу бактерій *Erwinia carotovora* ZM1 на інфекційність збудників м'якої гнилі. Мікробіологія і біотехнологія 4:18-28.
29. Сергеева ЖЮ, Басюл ОВ, Горшкова ОГ та ін (2016) Антагоністична активність лактобактерій, ізольованих із ферментованих рослинних продуктів із В'єтнаму. Мікробіологія і біотехнологія 4:50-59. doi: [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2016.4\(36\).86800](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2016.4(36).86800).
30. Тихоненко АС (1968) Ультраструктура вирусов бактерий, Москва.
31. Хоулт Дж, Криг Н, Смит П та ін (1997) Определитель бактерий Берджи в 2 томах, Мир, Москва.
32. Abdel-Aziz SM, Moustafa YA, Hamed HA (2014). Lactic acid bacteria in the green biocontrol against some phytopathogenic fungi: treatment of tomato seeds. J Basic Appl Sci Res 4(12):1-9.
33. Aguilar C, Klotz B (2010) Effect of the temperature on the antagonistic activity of lactic acid bacteria against *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. J Food Saf 30(4):996-1015. doi:10.1111/j.1745-4565.2010.00257.x.
34. Alakomi H-L, Skyttä E, Saarela M et al (2000) Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. Appl Environ Microbiol 66(5): 2001-2005.
35. Al-Mathkhury HJ, Ali AS, Ghafil JA (2011) Antagonistic effect of bacteriocin against urinary catheter associated *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. North Am J Med Sci 3(8):367-370. doi: 10.4297/najms.2011.3367.

36. Alvarez-Sieiro P, Montalbán-López M, Mu D et al (2016) Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Appl Microbiol Biotechnol* 100:2939-2951.doi:10.1007/s00253-016-7343-9.
37. Amel AM, Farida B, Djamila S (2015) Anti-adherence potencial of *Enterococcus durans* cells and its cell-free supernatant on plastic and stainless steel against foodborne pathogens. *Folia Microbiol* 60(4):357-363.doi:10.1007/s12223-014-0367-6.
38. Ammor S, Tauveron G, Dufour E et al (2006) Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility. 2 – Behaviour of pathogenic and spoilage bacteria in dual species biofilms including a bacteriocin-like-producing lactic acid bacteria. *Food Control* 17:462-468.doi:10.1016/j.foodcont.2005.02.007.
39. Arena MP, Silvain A, Normanno G et al (2016). Use of *Lactobacillus plantarum* strains as a bio-control strategy against food-borne pathogenic microorganisms. *Front Microbiol* 7:1-10.doi:10.3389/fmicb.2016.00464.
40. Arnison PG, Bibb MJ, Bierbaum G et al (2013) Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature. *Nat Prod Rep* 30:108-160. doi:10.1039/c2np20085f.
41. Atrih A, Rekhif N, Moir AJG et al (2001) Mode of action, purification and amino acid sequence of plantaricin C19, an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* C19. *Int J Food Microbiol* 68:93-104.
42. Audisio MC, Terzolo HR, Apella MC (2005) Bacteriocin from honeybee beebread *Enterococcus avium*, active against *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 71(6):3373-3375.doi:10.1128/AEM.71.6.3373-3375.2005.
43. Aymerich T, Holo H, Håvarstein LS et al (1996) Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Appl Environ Microbiol* 62(5):1676-1682.
44. Azat R, Liu Y, Li W et al (2016) Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally fermented Xinjiang cheese. *J Zhejiang Univ Sci B*

17(8):597-609. doi: 10.1631/jzus.B1500250.

45. Bajpai VK, Han J-H, Rather IA et al (2016) Characterization and antibacterial potential of lactic acid bacterium *Pediococcus pentosaceus* 4I1 isolated from freshwater fish *Zacco koreanus*. *Front Microbiol* 7:1-15. doi: 10.3389/fmicb.2016.02037.

46. Balasingham K, Valli C, Radhakrishnan L et al (2017) Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from swine intestine. *Vet World* 10(7):825-829. doi: 10.14202/vetworld.2017.825-829.

47. Balla E, Dicks LMT, Toit MDu et al (2000) Characterization and cloning of the genes encoding enterocin 1071A and Enterocin 1071B, two antimicrobial peptides produced by *Enterococcus faecalis* BFE 1071. *Appl Environ Microbiol* 66(4):1298-1304.

48. Belgacem ZB, Rehaïem A, Bernárdez PF et al (2012) Interactive effects of pH and temperature on the bacteriocin stability by response surface analysis. *Microbiologia* 81(2):195-200. doi: 10.1134/S002626171201002X.

49. Belguemsmia Y, Choiset Y, Prévost H et al (2010) Partial purification and characterization of the mode of action of enterocin S37: a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* S37 isolated from poultry feces. *J Environ Public Health* 2010:1-8. doi:10.1155/2010/986460.

50. Belhadj H, Harzallah D, Bouamra D et al (2014) Phenotypic and genotypic characterization of some lactic acid bacteria isolated from bee pollen: a preliminary study. *Biosci Microbiota Food Health* 33(1): 11-23.

51. Ben Omar N, Abriouel H, Keleke S et al (2008). Bacteriocin-producing *Lactobacillus* strains isolated from potopoto, a Congolese fermented maize product, and genetic fingerprinting of their plantaricin operons. *Int J Food Microbiol* 127:18-25. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.05.037.

52. Bennik MHJ, Vanloo B, Brasseur R et al (1998) A novel bacteriocin with a YGNGV motif from vegetable-associated *Enterococcus mundtii*: full characterization and interaction with target organisms. *Biochim Biophys Acta (BBA) – Biomembranes* 1373(1):47-58.

53. Billot-Klein D, Shlaes D, Bryant D et al (1996) Peptidoglycan structure of *Enterococcus faecium* expressing vancomycin resistance of the VanB type. *Biochem J* 313:711-715.
54. Birri DJ, Brede DA, Forberg T et al (2010) Molecular and genetic characterization of a novel bacteriocin locus in *Enterococcus avium* isolates from infants. *Appl Environ Microbiol*: 483-492.doi:10.1128/AEM.01597-09.
55. Booth MC, Bogie CP, Sahl HG et al (1996) Structural analysis and proteolytic activation of *Enterococcus faecalis* cytolysin, a novel lantibiotic. *Mol Microbiol* 21(6):1175-1184.
56. Bordignon Junior SE, Gatti DJ, Gelinski JMLN (2010) Antagonistic activity of lactic acid bacteria isolated from artisan Italian salami. *Braz J Food Technol* 13(1):18-22.doi:10.4260/BJFT2010130100003.
57. Breukink E, Wiedemann I, van Kraaij C et al (1999) Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science* 286(5448):2361-2364.
58. Bringel F, Castioni A, Olukoya DK et al (2005) *Lactobacillus plantarum* subsp. *argenteratensis* subsp. nov., isolated from vegetable matrices. *International J Syst Evol Microbiol* 55:1629-1634.doi:10.1099/ij.s.0.63333-0.
59. Broberg A, Jacobsson K, Ström K et al (2007) Metabolite profiles of lactic acid bacteria in grass silage. *Appl Environ Microbiol* 73(17):5547-5552.doi:10.1128/AEM.02939-06.
60. Casaus P, Nilsen T, Cintas LM et al (1997) Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology* 143:2287-2294. doi:10.1099/00221287-143-7-2287.
61. Chevallier B, Hubert JC, Kammerer B (1994) Determination of chromosome size and number of *rrn* loci in *Lactobacillus plantarum* by pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiol Lett* 1(120)(1-2):51-56.doi:https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1994.tb07006.x.
62. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ et al (1985) Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol* 22(6): 996-

1006.

63. Cintas LM, Rodriguez JM, Fernandez MF et al (1995) Isolation and characterization of pediocin L50, a new bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* with a broad inhibitory spectrum. *Appl Environ Microbiol* 61: 2643-2648.
64. Cintas LM, Casaus P, Håvarstein LS et al (1997) Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl Environ Microbiol* 63(11):4321-4330.
65. Cintas LM, Casaus P, Herranz C et al (2000) Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the sec-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *J Bacteriol* 182 (23):6806-6814.
66. Cintas LM, Casaus MP, Herranz C et al (2001) Review: bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Sci Technol Int* 7(4): 281-305. doi: <https://doi.org/10.1106/R8DE-P6HU-CLXP-5RYT>.
67. Cirkovik I, Bozic DD, Draganic V et al (2016) Licheniocin 50.2 and bacteriocins from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4 inhibit biofilms of coagulase negative staphylococci and *Listeria monocytogenes* clinical isolates. *PLOS ONE* 11(12):1-12. doi: 10.1371/journal.pone.0167995.
68. Cocolin L, Rantsiou K, Iacumin L et al (2004) Study of the ecology of fresh sausages and characterization of populations of lactic acid bacteria by molecular methods. *Appl Environ Microbiol* 70(4):1883-1894. doi: 10.1128/AEM.70.4.1883-1894.2004.
69. Cotter PD, Hill C, Ross RP (2005) Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol* 3(10):777-788. doi: 10.1038/nrmicro1273.
70. Cotter PD, Ross RP, Hill C (2013) Bacteriocins – a viable alternative to antibiotics?. *Nat Rev Microbiol* 11(2):95-105. doi: 10.1038/nrmicro2937.
71. De Kwaadsteniet M, Todorov SD, Knoetze H et al (2005) Characterization of a 3944 Da bacteriocin, produced by *Enterococcus mundtii* ST15, with activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Int J Food Microbiol* 105(3):433-444. doi:

10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.021.

72. De Vos P, Garrity GM, Jones D et al (eds) (2009) *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer, London, New York. doi:10.1007/b92997.

73. De Vuyst L, Schrijvers V, Paramithiotis S et al (2002) The biodiversity of lactic acid bacteria in Greek traditional wheat sourdoughs is reflected in both composition and metabolite formation. *Appl Environ Microbiol* 68(12):6059-6069. doi:10.1128/AEM.68.12.6059-6069.2002.

74. Del Campo R, Tenorio C, Jiménez-Díaz R et al (2001) Bacteriocin production in vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus* isolates of different origins. *Antimicrob Agents Chemother* 45(3):905-912. doi:10.1128/AAC.45.3.905-912.2001.

75. Dezwaan DC, Mequio MJ, Littell JS et al (2007) Purification and characterization of enterocin 62-6, a two-peptide bacteriocin produced by a vaginal strain *Enterococcus faecium*: Potential significance in bacterial vaginosis. *Microb Ecol Health Dis* 19(4):241-250. doi:10.1080/08910600701538240.

76. Dias FS, Ramos CL, Schwan RF (2013a) Characterization of spoilage bacteria in pork sausage by PCR-DGGE analysis. *Food Sci Technol* 33(3):468-474. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612013005000079>.

77. Dias FS, Duarte WF, Schwan RF (2013b) Evaluation of adhesive properties of presumptive probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *Biosci J* 29:1678-1686.

78. Djadouni F, Kihal M (2012) Antimicrobial activity of lactic acid bacteria and the spectrum of their biopeptides against spoiling germs in foods. *Braz Arch Biol Technol* 55(3):435-443.

79. Duangjitcharoen Y, Kantachote D, Ongsakul M et al (2008) Selection of probiotic lactic acid bacteria isolated from fermented plant beverages. *Pak J Biol Sci* 11(4):652-5.

80. Eguchi T, Kaminaka K, Shima J et al (2001) Isolation and characterization of enterocin SE-K4 produced by thermophilic enterococci, *Enterococcus faecalis* K-4. *Biosci Biotechnol Biochem* 65(2):247-253. doi:10.1271/bbb.65.247.

81. Eid R, El Jakee J, Rashidy A et al (2016) Potential antimicrobial activities of

probiotic *Lactobacillus* strains isolated from raw milk. J Prob Health 4(2):1-8. doi: dx.doi.org/10.4172/2329-8901.1000138.

82. Elayaraja S, Annamalai N, Mayavu P et al (2014) Production, purification and characterization of bacteriocin from *Lactobacillus murinus* AU06 and its broad antibacterial spectrum. Asian Pac J Trop Biomed 4:305-311 doi:10.12980/APJTB.4.2014C537.

83. El-Deeb N, Sharaf MM, El-Adawi H (2015) Antibacterial and plasmid curing activity of lactic acid bacteria against multidrug resistant bacteria strains. International Journal of Pharmacology 11(2):114-121. doi: 10.3923/ijp.2015.114.121.

84. Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39:783-791.

85. Fhoula I, Najjari A, Turki Y et al (2013) Diversity and Antimicrobial properties of lactic acid bacteria isolated from rhizosphere of olive trees and desert truffles of Tunisia. BioMed Res Int 2013:1-14. doi:http://dx.doi.org/10.1155/2013/405708.

86. Floriano B, Ruiz-Barba JL, Jimenez-Diaz R (1998) Purification and genetic characterization of enterocin I from *Enterococcus faecium* 6T1a, a novel antilisterial plasmid-encoded bacteriocin which does not belong to the pediocin family of bacteriocins. Appl Environ Microbiol 64(12):4883-4890.

87. Fortina MG, Ricci G, Acquati A et al (2003) Genetic characterization of some lactic acid bacteria occurring in an artisanal protected denomination origin (PDO) Italian cheese, the Toma piemontese. Food Microbiol 20:397-404.

88. Fortina MG, Ricci G, Mora D et al (2004) Molecular analysis of artisanal Italian cheeses reveals *Enterococcus italicus* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 54:1717-1721. doi: 10.1099/ijms.0.63190-0.

89. Franciosi E, Carafa I, Nardin T et al (2015) Biodiversity and γ -aminobutyric acid production by lactic acid bacteria isolated from traditional alpine raw cow's milk cheeses. BioMed Res Int: 1-11. http://dx.doi.org/10.1155/2015/625740.

90. Franz ChMAP, van Belkum MJ, Holzapfel WH et al (2007) Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. FEMS

Microbiol Rev 31:293-310. doi:10.1111/j.1574-6976.2007.00064.x.

91. Franz CM, Huch M, Abriouel H et al (2011) Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *Int J Food Microbiol* 151(2):125-140. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.014.
92. Gaaloul N, Braiek OB, Berjeaud JM et al (2014) Evaluation of antimicrobial activity and safety aspect of *Enterococcus italicus* GGN 10 strain isolated from Tunisian bovine raw milk. *J Food Saf*: 1-12. doi:10.1111/jfs.12126.
93. Gálvez A, Giménez-Gallego G, Maqueda M et al (1989) Purification and amino acid composition of peptide antibiotic AS-48 produced by *Streptococcus (Enterococcus) faecalis* subsp. *liquefaciens* S-48. *Antimicrob Agents Chemother* 33(4):437-441.
94. Gayathri D, Asha, Devaraja TN (2011) *Lactobacillus sp.* as probiotics for human health with special emphasis on colorectal cancer. *Indian J Sci Technol* 4(8):1008-1014.
95. Gillor O (2007) Bacteriocins' role in bacterial communication. In Riley MA, Chavan MA (eds) *Bacteriocins: Ecology and Evolution*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg. doi:https://doi.org/10.1007/978-3-540-36604-1_7.
96. Gillor O, Etzion A, Riley MA (2008) The dual role of bacteriocins as anti-and probiotics. *Appl Microbiol Biotechnol* 81(4): 591-606. doi: 10.1007/s00253-008-1726-5.
97. Griffiths E (1981) Iatrogenic plant diseases. *Ann Rev Phytopathol* 19:69-82.
98. Guerrant GO, Moss CW (1984) Determination of monosaccharides as aldononitrile, O-methylxime, alditol, and cyclitol acetate derivatives by gas-chromatography. *Anal Chem* 56(4):633-638. doi:10.1021/ac00268a010.
99. Guillet Ch, Join-Lambert O, Le Monnier A et al (2010) Human Listeriosis Caused by *Listeria ivanovii*. *Emerg Infect Dis* 16(1):136-138. doi:10.3201/eid1601.091155.
100. Gupta H, Malik RK, Bhardwaj A et al (2010) Purification and characterization of enterocin FH 99 produced by a faecal isolate *Enterococcus faecium* FH 99. *Indian J Microbiol* 50(2):145- 155. doi:10.1007/s12088-010-0039-4.

101. Gutiérrez J, Criado R, Martín M et al (2005) Production of enterocin P, an antilisterial pediocin-like bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13, in *Pichia pastoris*. *Antimicrob Agents Chemother* 49(7):3004-3008. doi:10.1128/AAC.49.7.3004-3008.2005.
102. Hassan M, Brede DA, Diep DB et al (2015) Efficient inactivation of multi-antibiotics resistant nosocomial enterococci by purified hiracin bacteriocin. *Adv Pharm Bull* 5(3):393-401. doi:10.15171/apb.2015.054.
103. Heng NCK, Wescombe PhA, Burton JP et al (2007) The diversity of bacteriocins in gram-positive bacteria. In: Riley MA, Chavan MA (eds) *Bacteriocins: Ecology and Evolution*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg. doi: 10.1007/978-3-540-36604-1_4.
104. Higa T, Kinjo S (1989) Effect of lactic acid fermentation bacteria on plant growth and soil humus formation. In: Parr JF, Hornick SB, Whitman C.E. (eds) *Proceedings of 1th Int Conf on Kyusei Nature Farming, Khon Kaen, 1989*.
105. H-Kittikun A, Biscola V, El-Ghaish Sh et al (2015) Bacteriocin-producing *Enterococcus faecalis* KT2W2G isolated from mangrove forests in southern Thailand: Purification, characterization and safety evaluation. *Food Control* 54:126-134. doi: dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.12.037.
106. Hor YY, Liong MT (2014) Use of extracellular extracts of lactic acid bacteria and bifidobacteria for the inhibition of dermatological pathogen *Staphylococcus aureus*. *Dermatol Sin* 32:141-147. doi: dx.doi.org/10.1016/j.dsi.2014.03.001.
107. Hu Ch-B, Malaphan W, Zendo T et al (2010) Enterocin X, a novel two-peptide bacteriocin from *Enterococcus faecium* KU-B5, has an antilisterial spectrum entirely different from those of its component peptides. *Appl Environ Microbiol* 76(13):4542-4545. doi:10.1128/AEM.02264-09.
108. Hwanhlem N, Biscola V, El-Ghaish Sh et al (2013) Bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from mangrove forests in southern Thailand as potential bio-control agents: purification and characterization of bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KT2W2L. *Probiotics Antimicro Prot* 5:264-278. doi: 10.1007/s12602-013-9150-2.

109. Hwanhlem N, Chobert J-M, H-Kittikun A (2014) Bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from mangrove forests in southern Thailand as potential bio-control agents in food: Isolation, screening and optimization. *Food Control* 41:202-211. doi: dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.01.021.
110. Hwanhlem N, Jaffrus E, Dousset X et al (2015) Application of a nisin Z-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KT2W2L isolated from brackish water for biopreservation in cooked, peeled and ionized tropical shrimps during storage at 8 °C under modified atmosphere packaging. *Eur Food Res Technol* 240:1259-1269. doi: 10.1007/s00217-015-2428-8.
111. Iacobellis NS, Figliuolo G, Janse J et al (1997) Characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens*. In: Rudolph K et al (eds) *Pseudomonas Syringae Pathovars and Related Pathogens*. Developments in Plant Pathology, vol 9. Kluwer Academic Publisher, pp 500-504.
112. Inoue T, Tomita H, Ike Y (2006) Bac 32, a novel bacteriocin widely disseminated among clinical isolates of *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 50(4):1202-1212. doi:10.1128/AAC.50.4.1202-1202.2006.
113. Izquierdo E, Wagner C, Marchioni E et al (2009a) Enterocin 96, a novel class II bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* WHE 96, isolated from munster cheese. *Appl Environ Microbiol* 75(13):4273-4276. doi:10.1128/AEM.02772-08.
114. Izquierdo E, Marchioni E, Aoude-Werner D et al (2009b) Smearing of soft cheese with *Enterococcus faecium* WHE 81, a multi-bacteriocin producer, against *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol* 26(1):16-20. doi:10.1016/j.fm.2008.08.002.
115. Jackson KD, Starkey M, Kremer S et al (2004) Identification of *psl*, a locus encoding a potential exopolysaccharide that is essential for *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm formation. *J Bacteriol* 186 (14):4466-4475. doi: 10.1128/JB.186.14.4466-4475.2004.
116. Jalali MD, Khosro I, Ghasemi MF et al (2012) Antagonism of *Lactobacillus* species against *Xanthomonas campestris* isolated from different plants. *J Appl Environ Biol Sci* 2(9):480-484.
117. Jámbor A, Molnár-Perl I (2009) Quantitation of amino acids in plasma by

high performance liquid chromatography: Simultaneous deproteinization and derivatization with 9-florenylmethyloxycarbonyl chloride. *J Chromatogr A* 1216(34): 6218-6223. doi: 10.1016/j.chroma.2009.06.083.

118. Jiménez E, Ladero V, Chico I et al (2013) Antibiotic resistance, virulence determinants and production of biogenic amines among enterococci from ovine, feline, canine, porcine and human milk. *BMC Microbiol* 13:1-12. doi:10.1186/1471-2180-13-288.

119. Jiménez PC, Castro MAP, Morgado BR et al. (2015) Lactic acid bacteria from fermented whey as a biocontrol tool against phytopathogenic microorganisms. *Ferment Technol* 3:2. <http://dx.doi.org/10.4172/2167-7972.S1.003>.

120. Joosten HM, Nunez M, Devreese B et al (1996) Purification and characterization of enterocin 4, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* INIA 4. *Appl Environ Microbiol* 62(11):4220-4223.

121. Joshi VK, Sharma S, Ran N.S (2006) Production, purification, stability and efficacy of bacteriocin from isolates of natural lactic acid fermentation of vegetables. *Food Technol Biotechnol* 44(3):435-439.

122. Kabuki T, Uenishi H, Watanabe M et al (2007) Characterization of a bacteriocin, thermophilin 1277, produced by *Streptococcus thermophilus* SBT1277. *J Appl Microbiol* 102(4):971-980. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03159.x.

123. Kachouri F, Ksontini H, El Abed S et al (2016) *Lactobacillus plantarum*: effect of a protective biofilm on the surface of olives during storage. *Braz J Microbiol* 47:202-209. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2015.11.028>.

124. Kalschne DL, Womer R, Mattana A et al (2015) Characterization of the spoilage lactic acid bacteria in «sliced vacuum-packed ham». *Braz J Microbiol* 64(1):173-181. doi:<http://dx.doi.org/10.1590/S1517-838246120130019>.

125. Kang SM, Radhakrishnan R, You Y-H et al (2015) Cucumber performance is improved by inoculation with plant growth - promoting microorganisms. *Acta Agric Scand B Soil Plant Sci* 65(1):36-44. doi: 10.1080/09064710.2014.960889.

126. Kannan NM, Abhiramy, Rajvanshi P (2014) Efficacy of a probiotic *Lactobacillus* as a Biocontrol agent and plant growth promoting bacteria by controlling

Xanthomonas campestris infection in chilli plant. International Journal of advances in Pharmacy, Biology and Chemistry 3(4):1016-1027.

127. Kawamoto Sh, Shima J, Sato R et al (2002) Biochemical and genetic characterization of Mundticin KS, an antilisterial peptide produced by *Enterococcus mundtii* NFRI 7393. Appl Environ Microbiol 68(8):3830-3840.doi:10.1128/AEM.68.8.3830-3840.2002.

128. Kawarai T, Furukawa S, Ogihara H et al (2007) Mixed-Species Biofilm Formation by Lactic Acid Bacteria and Rice Wine Yeasts. Appl Environ Microbiol 73(14):4673-4676.doi:10.1128/AEM.02891-06.

129. Kazempour MN, Kheyrgoo M, Pedramfar H et al (2010) Isolation and identification of bacterial glum blotch and leaf blight on wheat (*Triticum aestivum* L.) in Iran. Afr J Biotechnol 9(20):2860-2865.

130. Kim M-Ju, Jung M, Kim WJ (2015) Antilisterial effect of bacteriocin SH01, obtained from *Enterococcus faecium* SH01, in ground beef. Korean J Food Sci An 35(2):211-215.doi:http://dx.doi.org/10.5851/kosfa.2015.35.2.211.

131. Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J Mol Evol 16:111-120.

132. Klaenhammer TR (1993) Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol Rev 12(1-3):39-85.

133. Klewicka E, Libudzisz Z (2004) Antagonistic activity of *Lactobacillus acidophilus* bacteria towards selected food-contaminating bacteria. Pol J Food Nutr Sci 13/54(2):169-174.

134. Klockgether J, Munder A, Neugebauer J et al (2010) Genome diversity of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 laboratory strains. J Bacteriol 192(4):1113-1121. doi: 10.1128/JB.01515-09.

135. Koort J, Coenye T, Vandamme P et al (2004) *Enterococcus hermanniensis* sp. nov., from modified-atmosphere-packaged broiler meat and canine tonsils. Int J Syst Evol Microbiol 54:1823-1827. doi: 10.1099/ijs.0.63112-0.

136. Korotaeva NV, Kondratiuk TV, Basiul OV et al (2013) Effect of *Lactobacillus*

plantarum ONU87 in mixture with autolysate of erwinias on formation of tumors caused by *Rhizobium radiobacter* C58. Microbiology and Biotechnology 2:6-14.

137. Kubota H, Senda S, Nomura N et al (2008) Biofilm formation by lactic acid bacteria and resistance to environmental stress. J Biosci Bioeng 106(4):381-6.doi:10.1263/jbb.106.381.

138. Kwaadsteniet MDe, Fraser T, Van Reenen CA et al (2006) Bacteriocin T8, a novel class IIa sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* T8, isolated from vaginal secrets of children infected with human immunodeficiency virus. Appl Environ Microbiol 72(7):4761-4766.doi:10.1128/AEM.00436-06.

139. Lebreton F, Willems RJL, Gilmore MS (2014) *Enterococcus* diversity, origins in nature, and gut colonization. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y et al (eds) Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection. Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Boston: p 5-63.

140. Lengkey HAW, Balia RL, Togoe I et al (2009) Isolation and identification of lactic acid bacteria from raw poultry meat. Biotechnology in Animal Husbandry 25:1071-1077.

141. Li J, Aroutcheva AA, Faro S. et al (2005) Mode of action of lactocin 160, a bacteriocin from vaginal *Lactobacillus rhamnosus*. Infect Dis Obstet Gynecol 13(3): 135-140. doi: 10.1080/10647440500148156.

142. Li D, Ni K, Pang H et al (2015) Identification and antimicrobial activity detection of lactic acid bacteria isolated from corn stover silage. Asian Australas J Anim Sci 28(5):620-631.doi://http://dx.doi.org/10.5713/ajas.14.0439.

143. Lim H-J, Kim So-Y, Lee W-K (2004) Isolation of cholesterol-lowering lactic acid bacteria from human intestine for probiotic use. J Vet Sci 5(4):391-395.

144. Limanska N, Ivanytsia T, Choiset Y et al (2012) Effect of *Enterococcus durans* bacteriocin on bacterial wilt agent. Microbiology and Biotechnology 2:30-40.

145. Limanska N, Korotaeva N, Biscola V et al (2013) Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* against crown gall agent. In: Proceedings of the XIII Congress of Ukrainian Microbiological Society, Ialta, 1-6 of October 2013.

146. Limanska NV, Korotaeva NV, Yamborko GV et al (2014) Effect of

Lactobacillus plantarum on tumor formation caused by *Rhizobium radiobacter*. Microbiology and Biotechnology 1:8-18.

147. Limanska N, Merlich A, Galkin M et al (2015a) Lactobacilli from plant surfaces: the perspectives for biotechnology. In: Proceedings of the International Conference “Actual problems of microbiology and biotechnology”, Odessa, 1-4 June 2015.

148. Limanska N, Korotaeva N, Biscola V et al (2015b) Study of potential application of lactic acid bacteria in the control of infection caused by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Pathol Microbiol 6(8):1-9. doi:10.4172/2157-7471.1000292.

149. Limanska N, Merlich A, Ivanytsia V (2016) Effect of *Lactobacillus plantarum* on phytopathogens and plant growth. In: Proceedings of XII International scientific-applied conference «Biotechnology for agriculture and environmental protection», Odessa, 07-10 September 2016.

150. Lin Ch, Brent BE, Bolsen KK et al (1992) Epiphytic lactic acid bacteria succession during the pre-ensiling and ensiling periods of alfalfa and corn. Kansas Agricultural Experiment Station Research Reports 0(1):113-119. <https://doi.org/10.4148/2378-5977.2196>.

151. Line JE, Svetoch EA, Eruslanov BV et al (2008) Isolation and purification of enterocin E-760 with broad antimicrobial activity against Gram-Positive and Gram-negative bacteria. Antimicrob Agents Chemother 52(3):1094-1100. doi:10.1128/AAC.01569-06.

152. London J and Appleman MD (1962) Oxidative and glycerol metabolism of two species of enterococci. J Bacteriol 84:597-598.

153. Lutz MP, Michel V, Martinez Ch et al (2012) Lactic acid bacteria as biocontrol agents of soil-borne pathogens. Biological Control of Fungal and Bacterial Plant Pathogens IOBC-WPRS Bulletin 78:285-288.

154. Mahdavi M, Jalali M, Kermanshahi RK (2007) The effect of nisin on biofilm forming foodborne bacteria using microtiter plate method. Res Pharm Sci 2(2):113-118.

147. Maietti L, Bonvini B, Huys G et al (2007) Incidence of antibiotic resistance

and virulence determinants among *Enterococcus italicus* isolates from dairy products. *Syst Appl Microbiol* 30(6):509-517.<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2007.05.002>.

155. Maisnier-Patin S, Forni E, Richard J (1996) Purification, partial characterization and mode of action of enterococcin EFS2, an antilisterial bacteriocin produced by a strain of *Enterococcus faecalis* isolated from a cheese. *Int J Food Microbiol* 30(3):255-270.[doi:10.1016/0168-1605\(96\)00950-6](https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)00950-6).

156. Maldonado-Barragán A, Caballero-Guerrero B, Jiménez E et al (2009) Enterocin C, a class IIb bacteriocin produced by *E. faecalis* C901, a strain isolated from human colostrum. In *J Food Microbiol* 133:105-112. [doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.05.008](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.05.008).

157. Malini M, Savitha J (2012) Heat stable bacteriocin from *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* isolated from locally available cheese: An *in vitro* study. *E3 J Biotechnol Pharm Res* 3(2):28-41.

158. Martín-Platero AM, Valdivia E, Ruíz-Rodríguez M et al (2006) Characterization of antimicrobial substances produced by *Enterococcus faecalis* MRR 10-3, isolated from the uropygial gland of the hoopoe (*Upupa epops*). *Appl Environ Microbiol* 72(6):4245-4249.[doi:10.1128/AEM.02940-05](https://doi.org/10.1128/AEM.02940-05).

159. Mataragas M, Drosinos EH, Metaxopoulos J (2003) Antagonistic activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* in sliced cooked cured pork shoulder stored under vacuum or modified atmosphere at 4±2° C. *Food Microbiology* 20(2):259-265.[doi:https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(02\)00099-0](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(02)00099-0).

160. Merlich A (2017) Purification of bacteriocin from *Enterococcus italicus* ONU547 by reversed phase-high performance liquid chromatography. In: Proceedings of International conference of young scientists «Modern problems of microbiology and biotechnology», Odesa, 20-24 June 2017.

161. Merlich AG, Ivanytsia VO, Korotaeva NV et al (2013) *Lactobacillus plantarum* from berries of grape cultivated in the south of Ukraine. *Microbiology and Biotechnology* 3:31-39.

162. Merlich A, Choiset Y, Haertlé T et al (2017) Molecular mass determination of bacteriocin from *Enterococcus italicus* ONU547 by tricine-SDS-PAGE. In: Abstracts

of 7th International Weigl Conference, Lviv, Ukraine, 26-29 September 2017.

163. Mezaini A, Chihib N-E, Bouras AD et al (2009) Antibacterial activity of some lactic acid bacteria isolated from an Algerian dairy product. *J Environ Public Health* 2009:1-6.doi:10.1155/2009/678495.

164. Minervini F, Celano G, Lattanzi A et al (2015) Lactic acid bacteria are endophytic components of durum wheat plant following the whole life cycle from plant to flour. *Appl Environ Microbiol*: 1-26.doi:10.1128/AEM.01852-15.

165. Mounesh NV, Santhosh GP, Mahadevaswamy et al (2013) Antagonism of lactic acid bacteria against *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* isolated from rhizosphere, plant and fruits of tomato. In: Ramanathan A (ed) Proceedings of National seminar on Probiotics in Sustainable Food Production, Tamil Nadu, 15-16 March 2013. Current Satus and Future Prospects, vol 2. Bonfring, Coimbatore, p 355.

166. Mourad K, Halima Z-K, Nour-Eddine K (2004) Isolation of lactic acid bacteria for its possible use in the fermentation of green Algerian olives. *Grasas Aceites* 55(4): 385-393.

167. Müller T, Ulrich A, Ott EM et al (2001) Identification of plant-associated enterococci. *Appl Microbiol* 91(2): 268-278.

168. Mundt JO (1963) Occurrence of enterococci on plants in a wild environment. *Appl Microbiol* 11: 141-144.

169. Murthy KN, Malini M, Savitha J et al (2012) Lactic acid bacteria (LAB) as plant growth promoting bacteria (PGPB) for the control of wilt of tomato caused by *Ralstonia solanacearum*. *Pest Menagement in Horticultural Ecosystems* 18(1):60-65.

170. Nes IF, Diep DB, Håvarstein LS et al (1996) Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 70(2-4):113-128.

171. Ness IF, Diep DB, Ike Y (2014) Enterococcal bacteriocins and antimicrobial proteins that contribute to niche control. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y et al (eds) *Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection*. Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Boston, p 1-668.

172. Nikita Ch, Hemangi D (2012) Isolation, identification and characterization of lactic acid bacteria from dairy sludge sample. *J Environ Res Develop* 7(1A):234-244.

173. Nilsen T, Nes IF, Holo H (2003) Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Appl Environ Microbiol* 69(5):2975-2984. doi: 10.1128/AEM.69.5.2975-2984.2003.
174. Nissen-Meyer J, Holo H, Håvarstein LS et al (1992) A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *J Bacteriol* 174(17):5686-5692.
175. Nissen-Meyer J, Oppegård C, Rogne P et al (2010) Structure and mode-of-action of the two-peptide (class-IIIb) bacteriocins. *Probiotics Antimicrob Proteins* 2(1):52-60. doi:10.1007/s12602-009-9021-z.
176. Oberman H, Piatkiewicz A, Libudzisz Z (1982) Production of diacetyl and acetoin by lactic acid bacteria. *Mol Nutr Food Res* 26(7-8):615-623. doi: <https://doi.org/10.1002/food.19820260706>.
177. Okuda K, Zendo T, Sugimoto Sh et al (2013) Effects of bacteriocins on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm. *Antimicrob Agents Chemother* 57(11):5572-5579. doi:10.1128/AAC.00888-13.
178. Özogul F Hamed I (2017) The importance of lactic acid bacteria for the prevention of bacterial growth and their biogenic amines formation: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*.doi:10.1080/10408398.2016.1277972.
179. Pal V, Jamuna M, Jeevaratnam K (2004-2005) Isolation and characterization of bacteriocin producing lactic acid bacteria from a south Indian special dosa (appam) batter. *Journal of culture collections* 4:53-60.
180. Parente E, Grieco S, Crudele MA (2001) Phenotypic diversity of lactic acid bacteria isolated from fermented sausages produced in Basilicata (Southern Italy). *J Appl Microbiol* 90(6):943-952.
181. Passos FV, Fleming HP, Hassan HM et al (2003) Effect of malic acid on the growth kinetics of *Lactobacillus plantarum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 63 (2):207-211.doi:10.1007/s00253-003-1375-7.
182. Perez RH, Zendo T, Sonomoto K (2014) Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microb Cell Fact* 13 (1):1-8.doi:10.1186/1475-2859-13-S1-S3.

183. Pessione E (2012) Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows. *Front Cell Infect Microbiol* 2(86):1-15. doi:10.3389/fcimb.2012.00086.
184. Pholsen S, Khota W, Pang H et al (2016) Characterization and application of lactic acid bacteria for tropical silage preparation. *Anim Sci J* 87(10):1202-1211. doi:10.1111/asj.12534.
185. Pidgorskyi VS, Kovalenko NK, Garmasheva IL (2016) Taxonomic research, biological properties and biosynthetic activity of lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from various natural ecological niches. *Microbiol Zhurn* 78(6):8-18.
186. Pimentel-Filho Nde J, Martins MC, Nogueira GB et al (2014) Bovicin HC5 and nisin reduce *Staphylococcus aureus* adhesion to polystyrene and change the hydrophobicity profile and Gibbs free energy of adhesion. *Int J Food Microbiol* 190:1-8. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.004.
187. Rainey F and Oren A (eds) (2011) *Methods in Microbiology*. Academic Press. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387730-7.00020-6>.
188. Ribeiro S, Costa MC, Dapkevicius A et al (2012) Isolation and characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. Paper presented at the Proceedings of 11º Encontro de Química dos Alimentos, Braganza, 16-19 September 2012.
189. Rocourt J and Mollaret HH (1988) Taxonomy of the genus *Listeria*. *Infection* 16(2):89-91. doi: <https://doi.org/10.1007/BF01639728>.
190. Rodrigues L, van der Mei H, Teixeira JA et al (2004) Biosurfactant from *Lactococcus lactis* 53 inhibits microbial adhesion on silicone rubber. *Appl Microbiol Biotechnol* 66(3):306-311. doi: 10.1007/s00253-004-1674-7.
191. Ryder MH, Tate ME, Kerr A (1985) Virulence properties of strains of *Agrobacterium* on the apical and basal surfaces of carrot root discs. *Plant Physiol* 77:215-221.
192. Saad MA, Abdelsamei HM, Ibrahim EMA et al (2015) Effect of pH, heat treatments and proteinase K enzyme on the activity of *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin. *Benha Veterinary Medical Journal* 28(1):210-215.

193. Sabo SdS, Vitolo M, González JMD et al (2014) Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. Food Res Int 64:527:536.doi:10.1016/j.foodres.2014.07.041 .
194. Saeed S, Ahmad S, Rasool SA (2004) Antimicrobial spectrum, production and mode of action of staphylococcin 188 produced by *Staphylococcus aureus* 188. Pak J Pharm Sci 17(1):1-8.
195. Saelim K, Kaewsuwan S, Tani A, Maneerat S (2015) Physical, biochemical and genetic characterization of enterocin CE5-1 produced by *Enterococcus faecium* CE5-1 isolated from Thai indigenous chicken intestinal tract. Songklanakarin J Sci Technol 37(3):299-307.
196. Şahingil D, İşleroğlu H, Yildirim Z et al (2011) Characterization of lactococcinBZ produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BZ isolated from boza. Tukur J Biol 35:21-33. doi:10.3906/biy-0906-48.
197. Saitou N and Nei M (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol 4:406-425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>.
198. Salman M, Shahid M, Jamil A et al (2014) Effect of *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin on *Bacillus cereus* biofilms. J Pure Appl Microbio 8(5):3721-3728.
199. Samelis J, Kakouri A, Rementzis J (2000) Selective effect of the product type and the packaging conditions on the species of lactic acid bacteria dominating the spoilage microbial association of cooked meats at 4 °C. Food Microbiol 17(3):329-340. doi : <https://doi.org/10.1006/fmic.1999.0316>.
200. Sánchez-Hidalgo M, Maqueda M, Gálvez A et al (2003) The genes coding for enterocin EJ97 production by *Enterococcus faecalis* EJ97 are located on a conjugative plasmid. Appl Environ Microbiol 69(3):1633-1641.doi:10.1128/AEM.69.3.1633-1641.2003.
201. Sawa N, Wilaipun P, Kinoshita S et al (2012) Isolation and characterization of enterocin W, a novel two-peptide lantibiotic produced by *Enterococcus faecalis* NKR-4-1. Appl Environ Microbiol 78 (3):900-903. doi: 10.1128/AEM.06497-11.
202. Schägger H and von Jagow G (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-

polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166(2): 368-379.

203. Schillinger U and Lüke F-K (1989) Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl Environ Microbiol* 55(8):1901-1906.

204. Seo S-H, Jung M, Kim WJ (2014) Antilisterial and amylase-sensitive bacteriocin producing *Enterococcus faecium* SH01 from Mukeunji, a Korean over-ripened kimchi. *Food Sci Biotechnol* 23(4):1177-1184. doi:10.1007/s10068-014-0161-x.

205. Serna-Cock L, Camargo-Guarnizo AF, Rengifo-Guerrero CA (2013) Antimicrobial activity against *Xanthomonas albilineans* and fermentation kinetics of a lactic acid bacterium isolated from the sugar cane crop. *Chil J Agr Res* 73(3):250-258. doi:10.4067/S0718-58392013000300007.

206. Shekh RM, Roy U (2012) Biochemical characterization of an anti-Candida factor produced by *Enterococcus faecalis*. *BMC Microbiol* 12:132. doi:10.1186/1471-2180-12-132.

207. Shin JM, Gwak JW, Kamarajan P et al (2016) Biomedical applications of nisin. *J Appl Microbiol* 120(6):1449-1465. doi:10.1111/jam.13033.

208. Shrestha A, Kim ECh, Lim ChK et al (2009) Biological control of soft rot on chinese cabbage using beneficial bacterial agents in greenhouse and field. *The Korean J Pestic Sci* 13(4):325-331.

209. Shrestha A, Kim BS, Park DH (2014) Biological control of bacterial spot disease and plant growth-promoting effects of lactic acid bacteria on pepper. *Biocontrol Sci Technol* 24(7):763-779. doi:10.1080/09583157.2014.894495.

210. Siezen RJ, van Hylckama Vlieg JET (2011) Genomic diversity and versatility of *Lactobacillus plantarum*, a natural metabolic engineer. *Microb Cell Fact* 10(1):1-13. doi:10.1186/1475-2859-10-S1-S3.

211. Sifour M, Ouled-Haddar H, Idoui T et al (2014) Screening of some factors affecting bacteriocin production from *Lactobacillus curvatus* G6 using Plackett-Burman design. *RRBS* 8(10):386-393.

212. Simões LCh, Simões M, Vieira MJ (2011) The effects of metabolite

- molecules produced by drinking water-isolated bacteria on their single and multispecies biofilms. *Biofouling* 27(7):685-699. doi: 10.1080/08927014.2011.597502.
213. Song D-F, Zhu M-Y, Gu Q (2014) Purification and characterization of plantaricin ZJ5, a new bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ZJ5. *PLoS ONE* 9(8):1-8. doi: doi.org/10.1371/journal.pone.0105549.
214. Subramanian S, Smith DL (2015) Bacteriocins from the rhizosphere microbiome – from an agriculture perspective. *Front Plant Sci* 6:1-7. doi:10.3389/fpls.2015.00909.
215. Sukontasing S, Tanasupawat S, Moonmangmee S et al (2007) *Enterococcus camelliae* sp. nov., isolated from fermented tea leaves in Thailand. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:2151-2154. doi:10.1099/ijs.0.65109-0.
216. Sumathi V, Reetha D (2012) Screening of Lactic Acid Bacteria for their Antimicrobial Activity against Pathogenic Bacteria. *Int J Pharm Biol Arch* 3(4):802-808.
217. Tamura K, Stecher G, Peterson D et al (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725-2729. doi: 10.1093/molbev/mst197.
218. Teixeira LM, Carvalho MdaGS, Espinola MMB et al (2001) *Enterococcus porcinus* sp. nov. and *Enterococcus ratti* sp. nov., associated with enteric disorders in animals. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:1737-1743.
219. Testa B, Lombardi SJ, Tremonte P et al (2014) Biodiversity of *Lactobacillus plantarum* from traditional Italian wines. *World J Microbiol Biotechnol* 30:2299-2305. doi:10.1007/s11274-014-1654-8.
220. Tiwari A, Singh NP, Sharma G et al (2015) Isolation and screening of lactic acid bacteria producing bacteriocin like inhibitory substance from soil. *Int J Pharmacol Pharm Sci* 2(6):32-36.
221. Todorov SD, Wachsman M, Tomé E et al (2010) Characterization of an antiviral pediocin-like bacteriocin produced by *Enterococcus faecium*. *Food Microbiology* 27(7):869-879. doi:10.1016/j.fm.2010.05.001.
222. Tomita H, Fujimoto Sh, Tanimoto K et al (1996) Cloning and genetic

organization of the bacteriocin 31 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pYI17. J Bacteriol 178(12): 3585-3593.

223. Tomita H, Fujimoto Sh, Tanimoto K et al (1997) Cloning and genetic sequence analyses of the bacteriocin 21 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pPD1. J Bacteriol 179(24):7843-7855.

224. Trias R, Baneras L, Montesinos E et al (2008) Lactic acid bacteria from fresh fruit and vegetables as biocontrol agents of phytopathogenic bacteria and fungi. Int Microbiol 11:231-236.doi:10.2436/20.1501.01.66.

225. Uraipan S, Hongpattarakere T (2015) Antagonistic characteristics against food-borne pathogenic bacteria of lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from feces of healthy Thai infants. Jundishapur J Microbiol 8(6):1-9.doi:10.5812/jjm.8(6)2015.18264.

226. Vancanneyt M, Zamfir M, Devriese LA et al (2004) *Enterococcus saccharominimus* sp. nov., from dairy products. Int J Syst Evol Microbiol 54:2175-2179.doi:10.1099/ijs.0.63193-0.

227. Vasulyk OM, Garmasheva IL, Kovalenko NK (2014) Probiotic properties of strains of *Lactobacillus plantarum* isolated from fermented products. Microbiology and Biotechnology 3:23-30.

228. Vázquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P et al (2001) *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. Clin Microbiol Rev 14(3):584-640. doi: 10.1128/CMR.14.3.584-640.2001.

229. Vela Gurovic MS, Gentili AR, Olivera NL et al (2014) Lactic acid bacteria isolated from fish gut produce conjugated linoleic acid without the addition of exogenous substrate. Process Biochem 49(7):1071-1077. doi: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.04.004>.

230. Visser R, Holzapfel WH (1992) Lactic acid bacteria in the control of plant pathogens. In: Wood BJB (ed) The lactic acid bacteria, vol 1, Elsevier Applied Science, London and New York, pp 193-210.

231. Visser R, Holzapfel WH, Bezuidenhout JJ et al (1986) Antagonism of lactic

- acid bacteria against phytopathogenic bacteria. *Appl Environ Microbiol* 52(3):552-555.
232. Wachsman MB, Fariás ME, Takeda E et al (1999) Antiviral activity of enterocin CRL35 against herpesviruses. *Int J Antimicrob Agents* 12:293-299.doi:[https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(99\)00078-3](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(99)00078-3).
233. Wang T, Liu M (2016) The effect of bacteriocins derived from lactic acid bacteria on growth and biofilm formation of clinical pathogenic strains. *Int J Clin Exp Med* 9(4):7343-7348.
234. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA et al (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* : 697-703.
235. Wessels S, Axelsson L, Hansen EB et al (2004) The lactic acid bacteria, the food chain, and their regulation. *Trends Food Sci Technol* 15:498-505.doi:10.1016/j.tifs.2004.03.003.
236. Winkelströter LK, Gomes BC, Thomaz MRS et al (2011) *Lactobacillus sakei* 1 and its bacteriocin influence adhesion of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. *Food Control* 22(8):1404-1407. doi:10.1016/j.foodcont.2011.02.021.
237. Yamamoto Y, Togawa Y, Shimosaka M et al (2003) Purification and characterization of a novel bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* strain RJ-11. *Appl Environ Microbiol* 69(10):5746-5753.doi:10.1128/AEM.69.10.5746-5753.2003.
238. Yoneyama F, Imura Y, Ohno K et al (2009) Peptide-lipid huge toroidal pore, a new antimicrobial mechanism mediated by a Lactococcal bacteriocin, lacticin Q. *Antimicrob Agents Chemother* 53(8):3211-3217. doi: 10.1128/AAC.00209-09.
239. Zacharof MP, Lovittb RW (2012) Bacteriocins produced by lactic acid bacteria. A review article. *APCBEE Procedia* 2:50-56.doi:10.1016/j.apcbee.2012.06.010.
240. Zalán Z, Hudáček, Stetina J et al (2010) Production of organic acids by *Lactobacillus* strains in three different media. *Eur Food Res Technol* 230:395-404.doi:10.1007/s00217-009-1179-9.
241. Zhang H, Xie L, Zhang W et al (2013) The Association of Biofilm Formation with Antibiotic Resistance in Lactic Acid Bacteria from Fermented Foods. *J Food Saf*

33(2):114-120.doi:10.1111/jfs.12030.

242. Zhunko ID, Merlich AG, Limanska NV (2017) Effect of *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus atrophaeus* on growth of wheat seedlings In: International conference of young scientists «Modern problems of microbiology and biotechnology», Odesa, 20-24 June 2017.

243. Zmantar T, Slama RB, Fahila K et al (2016) Modulation of drug resistance and biofilm formation of *Staphylococcus aureus* isolated from the oral cavity of Tunisian children. Braz J Infect Dis: 1-8. doi: doi.org/10.1016/j.bjid.2016.10.009.

244. http://www.midi-inc.com/pdf/Sherlock_MIS_Operating_Manual.pdf.

245. <http://www.tgw1916.net/Streptococcus/italicus.html>.

246. <https://rooftopecology.wordpress.com/2009/09/29/korean-natural-farming-lactic-acid-bacteria-lab/>.

Titre : titre (en français) Caractérisation de la souche *Enterococcus italicus* ONU547 productrice de bactériocine

Mots clés : *E. italicus* ONU547, bactériocine, biofilm

Résumé : Le mémoire est consacré à l'étude de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques (BL) isolées de produits fermentés collectés sur les marchés d'Ukraine, de France et de Thaïlande, à recherche parmi elles une productrice de bactériocine et à l'étude ses caractéristiques.

Pendant le dépistage d'activité bactériocinogène une souche bactérienne capable de produire une bactériocine a été isolée du chou fermenté de Thaïlande et ses propriétés morphologiques, culturelles, physiologiques, biochimiques et le séquençage du fragment du gène de l'ARNr 16S ont permis de l'identifier comme *Enterococcus italicus*. C'est le premier rapport sur l'isolation de souche d'*E. italicus*, capable de produire une bactériocine, du matériel végétal.

Il a été montré pour la première fois que l'entérocoque purifiée inhibe une formation de biofilms par *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 et par *P. aeruginosa* PAO1 de 52.5 % et 48.0 %, respectivement. La bactériocine du surnageant inhibe la formation de biofilm de *P. aeruginosa* PAO1 de 41.4 %.

Il a été montré que les bactéries de la souche *E. italicus* ONU547 inhibent la croissance des bactéries phytopathogènes *R. radiobacter* C58 et *E. carotovora* ZM1 *in vivo* sur des explants de carottes de 33.3 et 24.8 %.

Alors, à l'appui des résultats obtenus on peut faire la conclusion que la bactériocine d'*E. italicus* ONU547 peut être prometteuse comme un conservateur alimentaire. La souche *E. italicus* ONU547 et les souches *L. plantarum* peuvent être recommandées pour le développer des préparations biologiques de protection des plantes.

Titre : titre (en anglais) Characterization of *Enterococcus italicus* ONU547 strain bacteriocin producer

Keywords : *E. italicus* ONU547, bacteriocin, biofilm

Abstract : The thesis is dedicated to study of antimicrobial activity of lactic acid bacteria (LAB) isolated from fermented products collected on markets of Ukraine, France and Thailand, to search a bacteriocin producer among them and to study of its characteristics.

A bacterial strain able to produce a bacteriocin was isolated from Thai fermented cabbage during screening for bacteriocinogenic activity that was identified based on morphological, cultural, physiological, biochemical properties and on sequencing of 16S rRNA gene fragment as *Enterococcus italicus*.

This is the first report about isolation of *E. italicus* strain able to produce bacteriocin from plant material.

It was showed for the first time that purified enterocin inhibits biofilm formation in *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 and in *P. aeruginosa* PAO1 in 52.5% and 48.0%, respectively. Bacteriocin from CFS inhibits biofilm formation in *P. aeruginosa* PAO1 in 41.4%.

It was showed that bacteria of *E. italicus* ONU547 strain inhibit growth of plant pathogenic bacteria *R. radiobacter* C58 and *E. carotovora* ZM1 *in vivo* on carrot explants in 33.3 and 24.8%.

Hence, based on the obtained results it is possible to conclude that bacteriocin of *E. italicus* ONU547 can be perspective as food preservative. The strain *E. italicus* ONU547 and the strains of *L. plantarum* can be recommended for development of biological preparations for plant protection.

