

К.Д. Крилова, Ж.Ю. Сергєєва, О.В. БасюлОдеський національний університет імені І.І. Мечникова, вул. Дворянська, 2,
Одеса, 65082, Україна, тел.:+38 (048) 68 79 64, e-mail: k.d.krylova@gmail.com

АНТИМІКРОБНА АКТИВНІСТЬ ДО ЗБУДНИКА М'ЯКОЇ ГНИЛІ КОМПЛЕКСУ МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ І КАРОТОВОРИЦИНІВ ЗА ЗБЕРІГАННЯ

Мета роботи. Визначити залежність активності комплексу каротоворицинів *Erwinia carotovora* ОНУ320 та бактерій *Lactobacillus plantarum* ОНУ87, якому властива антимікробна дія до фітопатогенних ервіній, від температури та терміну зберігання. **Матеріали і методи.** До складу комплексу входять каротоворицини (дефектні фагові частки) штаму *E. carotovora* ОНУ320, одержані шляхом спонтанної індукції, та бактерії *L. plantarum* ОНУ87 (титр 10^5 КУО/мл) у співвідношенні 1:1. Комплекс каротоворицинів і лактобацил та його окремі компоненти зберігали впродовж 31 доби за температури 20; 4; -20 °С. Кілерну активність каротоворицину визначали за розміром зон лізису на газоні індикаторного штаму ервіній. Життєздатність лактобактерій *L. plantarum* ОНУ87 визначали за зміною чисельності шляхом культивування на цільному середовищі MRS. **Результати.** Встановлено, що максимальна життєздатність клітин *L. plantarum* ОНУ87 зберігається за температури -20 °С при додаванні гліцерину порівняно до цього ж показника за температури 4 та 20 °С. Показано, що присутність лактобактерій *L. plantarum* ОНУ87 негативно впливає на активність каротоворицинів при зберіганні у суміші за температури 4 та 20 °С. **Висновки.** Зниження активності каротоворицину за температури 4 та 20 °С у присутності лактобактерій, ймовірно, відбувається за рахунок дестабілізації білків, які утворюють дефектні фагові відростки, та самовільного скорочення фагових хвостових відростків під час зберігання.

Ключові слова: зберігання, фітопатогени, бактеріоцин, *Erwinia carotovora*, *Lactobacillus plantarum*

В останні роки все більше поширюється застосування бактеріофагів для лікування різноманітних інфекційних хвороб людини, тварин та в захисті рослин [1, 2]. Додавання до складу біопрепарату бактеріоцинів фагової природи на рівні з повноцінними фаговими частками може розширити коло кілерної активності та підвищити його захисний ефект [3].

За рахунок дефектної полілізогенії у фітопатогенної бактерії *Erwinia carotovora* утворюється значна кількість дефектних фагових часток, зокрема хвостових відростків [4]. Дефектні фагові частки, названі макромолекулярними каротоворицинами, характеризуються широким спектром антибактеріальної активності до споріднених бактерій [5].



Останнім часом все більше з'являються повідомлення про ефективність застосування лактобактерій для захисту рослин від фітопатогенних бактерій [6, 13]. Окрім антагоністичного впливу на патогени для лактобацил показано і стимулювальний вплив щодо рослини-хозяїна, що відкриває нові перспективи для їх використання у складі біопрепаратів для рослинництва [7].

В попередніх дослідженнях було показано ефективність захисного впливу сумісного застосування *Lactobacillus plantarum* ОНУ87 та каротоворицинів бактерій штаму *Erwinia carotovora* ОНУ320 від ураження коренеплодів та бульб картоплі збудником м'якої гнилі [6, 7, 12]. За довготривалого зберігання кароворицинів спостерігалося зниження їх кілерної активності [8]. Бактерії штаму *L. plantarum* ОНУ87, за попередніми даними, при зберіганні за температури 4 °С залишаються життєздатними впродовж 2 місяців [12]. Отже, дві складові захисного комплексу можуть як вимагати різних умов зберігання, так і зменшувати антимікробну активність.

Метою дослідження було визначити залежність активності комплексу каротоворицинів *Erwinia carotovora* ОНУ320 та бактерій *Lactobacillus plantarum* ОНУ87, який характеризується антимікробною дією відносно фітопатогенних ервіній, від температури та терміну зберігання.

Матеріали і методи

Захисний комплекс складається з каротоворицинів штаму *E. carotovora* ОНУ320 та бактеріальних клітин *L. plantarum* ОНУ87 у рівних об'ємах. Каротоворицини *E. carotovora* ZM1 одержували шляхом спонтанної індукції на оптимізованому середовищі А3 [6]. Лактобактерії *L. plantarum* ОНУ87 вирощували у бульоні MRS за температури 37 °С протягом 24 годин до одержання титру 10^{10} КУО/мл [6, 9].

Захисний комплекс і його окремі компоненти витримували протягом 31 доби за температури 20, 4 та -20 °С. Контроль стабільності окремих компонентів і їх суміші проводили впродовж 31 доби зберігання. Стабільність каротоворицинів *E. carotovora* ОНУ320 як окремого компоненту, так і у суміші з лактобактеріями визначали за показником кілерної активності до штама-індикатора *E. carotovora* ОНУ319 [6]. Концентрацію бактерій штаму *L. plantarum* ОНУ87 визначали шляхом посіву на щільне середовище MRS. Для збереження життєздатності лактобацил за температури -20 °С у криопробірці з одним мл захисної суміші вносили 250 мкл гліцерину [10].

Статистичне опрацювання результатів здійснювали загальноприйнятими методами варіаційного та кореляційного аналізу з застосуванням програми Microsoft Excel 2010. Вірогідність відмінностей отриманих результатів оцінювали на рівні значимості не менше 95%.

Результати та їх обговорення

У ході проведених досліджень встановлено, що активність бактеріоцину знижується на 14 добу лише за умови зберігання за температури 20 °С, але не втрачається повністю навіть на 30 добу експерименту (табл. 1).



Активність каротоворицинів *E. carotovora* ОНУ320 за різних строків і температури зберігання

Table 1

E. carotovora ОНУ320 carotovoricines activity under different terms and conditions of storage

Доба	Активність каротоворицину					
	Каротоворицин та лактобактерії			Каротоворицин		
	20 °С	4 °С	-20 °С	20 °С	4 °С	-20 °С
1	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+
3	-	+	+	+	+	+
5	-	+	+	+	+	+
7	-	+	+	+	+	+
10	-	+	+	+	+	+
14	-	+/-	+	+/-	+	+
21	-	+/-	+	+/-	+	+
30	-	+/-	+	+/-	+	+

Примітка: «+» – наявність кілерної активності, «+/-» – зменшення прозорості та/або розміру зон лізису, «-» – відсутність кілерної активності

Note: «+» – availability of killer activity, «+/-» – decrease of transparence and/or size of lysis zones, «-» – absence of killer activity

Активність каротоворицину не зникає навіть при -20 °С у замерзлому середовищі без гліцерину. Водночас показано, що додавання гліцерину перед заморожуванням до каротоворицину також не впливає на його активність (рис. 1Г-5).

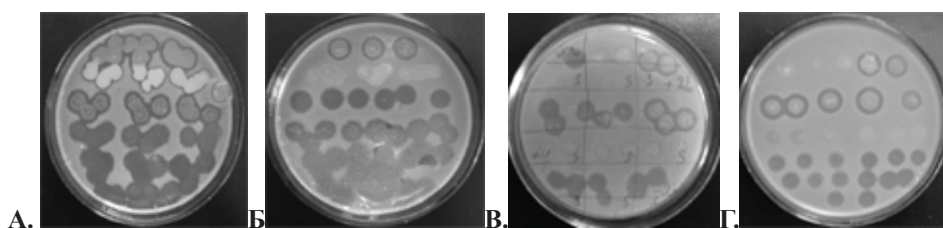


Рис. 1. Кілерна активність каротоворицину на першу (А), третю (Б), чотирнадцяту (В) і тридцяту (Г) добу зберігання: при 20 °С каротоворицин (1), суміш (2); при 4 °С каротоворицин (3), суміш (4); при -20 °С каротоворицин (5), суміш (6)

Fig. 1. Carovoricines killer activity on the first (A), third (B), fourteenth (V) and thirtieth (Г) preservation day: at 20 °С carovoricene (1), mixture (2); at 4 °С carovoricene (3), mixture (4); at -20 °С carovoricene (5), mixture (6)

При зберіганні за температури 20 °С і 4 °С чисельність лактобацил незначно повільно зростає впродовж перших 3 діб (рис. 2). За -20 °С чисельність лактобацил впродовж 5 діб не зменшувалася і в подальшому життєздатність клітин у цих зразках залишилася на високому рівні. Зафіксоване зростання титру за 20 °С і 4 °С можна пояснити тим, що штам *L. plantarum* ОНУ87 є природним ізолятом, і фізіологічно адаптований до росту в широкому діапазоні температур [13].

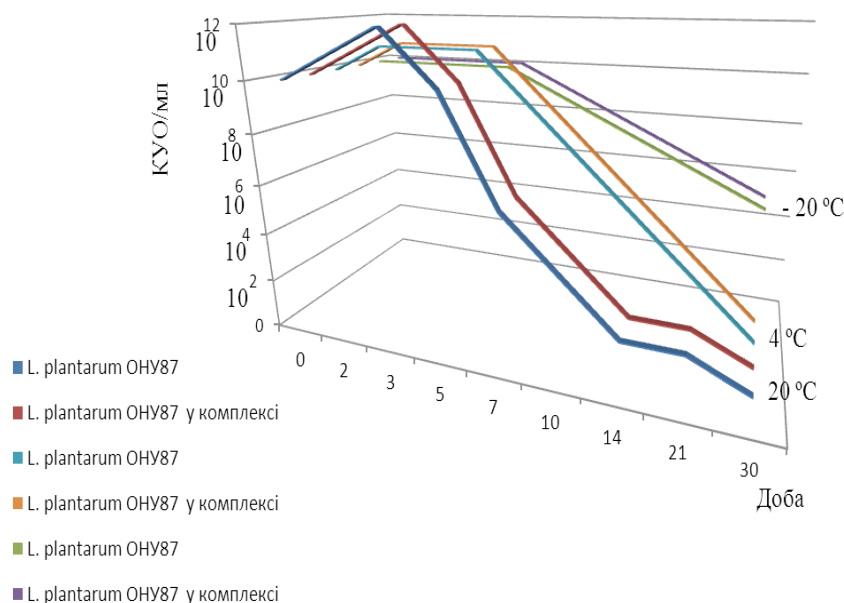


Рис. 2. Життєздатність *L. plantarum* ОНУ87 при зберіганні

Fig. 2. *L. plantarum* ONU 87 viability during preservation

Більш повільне зниження титру *L. plantarum* ОНУ87 під час зберігання за температури 4 °С, порівняно з цим показником за температури 20 °С, можна пояснити зниженням метаболічних процесів у клітинах бактерій, що проявляється також в більш повільному накопиченні метаболітів. Починаючи з 5-ої до 30-ої доби, за усіх температур зберігання, показано поступове зменшення титру бактерій *L. plantarum* ОНУ87 з 10⁹ КУО/мл до 10 КУО/мл (рис. 2, 3).

У випадку зберігання комплексу за різних температур графік чисельності лактобактерій змінюється з такою ж закономірністю, як і без каротоворицинового компоненту (рис. 2).

Щодо активності каротоворицину у складі комплексу, то після першого тижня зберігання при температурі 4 і -20 °С змін відмічено не було. Зберігання суміші при 20 °С призвело до повного зникнення активності макромолекулярного каротоворицину вже після третьої доби. При цьому можна відмітити, що

у бактеріоцину, який зберігався окремо в аналогічних умовах активність, не знизилася (рис. 1, табл. 1).

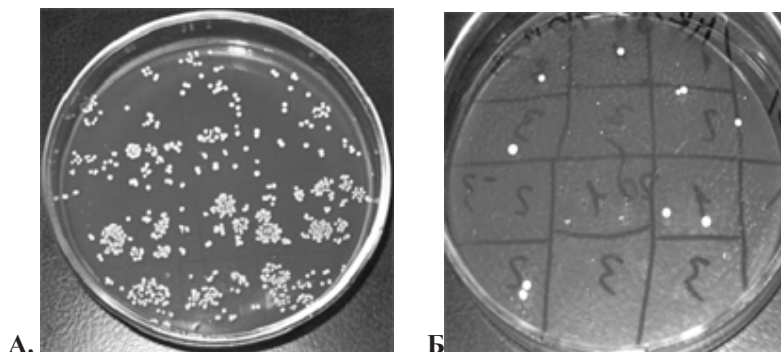


Рис. 3. Колонії *L. plantarum* ОНУ87 на середовищі MRS при зберіганні у складі комплексу з каротоворицинами за температури $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ на початку експерименту(А) і на 30 добу (Б)

Fig. 3. Colonies of *L. plantarum* ОНУ87 on MRS medium in complex with carotovoricines at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ on the beginning (A) and the 30 day of the experiment (B)

Через 14 діб зберігання за температури $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ відмічено зменшення активності каротоворицину у суміші з *L. plantarum* ОНУ87. Через 30 діб після початку дослідження вихідна активність каротоворицину (прозорість та розмір зон лізису) у складі захисної суміші на газоні чутливої культури спостерігалась лише у зразках, які зберігались за температури $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ (рис. 1).

Таким чином, каротоворицин *E. carotovora* ОНУ320 у комплексі з бактеріями штаму *L. plantarum* ОНУ87 зберігає антимікробну активність проти збудника м'якої гнилі за температури $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ не більше двох діб, при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ – до 14 діб, а за $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ – впродовж усього терміну дослідження. Зниження активності каротоворицину за температури 4 та $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ у присутності лактобактерій, ймовірно, відбувається за рахунок дестабілізації білків, які утворюють дефектні фагові відростки, та самовільного скорочення цих відростків [7, 11]. Таким чином, наявність молочнокислих бактерій та їх метаболітів у середовищі дестабілізує каротоворициновий компонент та знижує його активність у захисній суміші при зберіганні за температури 4 і $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, що проявляється як зменшення діаметру і прозорості зон лізису на газоні індикаторної бактерії [7].

Е.Д. Крылова, Ж.Ю. Сергеева, Е.В. Басюл

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова, ул. Дворянская, 2,
Одесса, 65082, Украина, тел. 8 (048) 68 79 64, e-mail: k.d.krylova@gmail.com

АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОТИВ ВОЗБУДИТЕЛЯ МЯГКОЙ ГНИЛИ КОМПЛЕКСА МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРИЙ И КАРОТОВОРИЦИНОВ ПРИ ХРАНЕНИИ

Реферат

Цель работы. Определить зависимость активности комплекса каротоворицинов *Erwinia carotovora* ОНУ320 и бактерий *Lactobacillus plantarum* ОНУ87, который характеризуется противомикробным действием в отношении фитопатогенных эрвиний, от температуры и срока хранения. **Материалы и методы.** В состав комплекса входят каротоворицины (дефектные фаговые частицы) штамма *E. carotovora* ОНУ320, полученные путем спонтанной индукции, и бактерий *L. plantarum* ОНУ87 (титр клеток 10^5 КОЕ / мл) в соотношении 1:1. Комплекс каротоворицинов и лактобацилл и каждый его отдельный хранили в течение 31 суток при температуре -20, 4 и 20 °С. Киллерную активность каротоворицинов определяли по размеру зон лизиса на газоне индикаторного штамма эрвиний. Жизнеспособность лактобактерий *L. plantarum* ОНУ87 определяли по изменению численности путем культивирования на плотной питательной среде MRS.. **Результаты.** Установлено, что максимальная жизнеспособность клеток *L. plantarum* ОНУ87 сохраняется при температуре хранения -20 °С с добавлением глицерина, по сравнению к этому же показателю при температуре хранения 4 и 20 °С. Показано, что присутствие лактобацилл негативно влияет на активность каротоворицинов при хранении в смеси при температуре 20 и 4 °С. **Выводы.** Снижение активности каротоворицинов при температуре хранения 20 и 4 °С в присутствии лактобактерий, вероятнее всего, происходит за счет дестабилизации белков, которые образуют дефектные фаговые отростки, и самопроизвольного сокращения эти хвостовых отростков.

Ключевые слова: хранение, фитопатогены, бактериоцин, *Erwinia carotovora*, *Lactobacillus plantarum*.

К.Д. Krylova, Zh.Yu. Sergeeva, O.V. Basiul

Odesa National I. I. Mechnykov University, 2, Dvoryanska str.,
Odesa, 65082, Ukraine, tel.:+38 (048) 68 79 64, e-mail: k.d.krylova@gmail.com

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF THE LACTIC ACID BACTERIA AND CAROTOVORICENES COMPLEX AGAINST THE SOFT ROT CAUSATIVE AGENT DURING THE STORAGE

Summary

Aim. To determine correlation between the storage conditions and the activity of complex from *Erwinia carotovora* ОНУ320 carotovoricenes and *Lactobacillus plantarum* ОНУ87 active against phytopathogenic erwinias. **Materials and methods.** The complex



consists of carotovoricines (defective phage particles) from the strain *E. carotovora* OHV320, obtained by spontaneous induction, and of bacteria *L. plantarum* ONU87 (cells titer – 10^5 CFU/ml) in 1:1. The complex and each component separately were stored for 31 days at -20, 4 and 20 °C. Stability control of the individual components of the mixture (bacteriocins killer activity and lactobacilli cells titer determination) was performed during all term of storage. Carotovoricines killer activity was determined according to size and diameter of lysing zones. *L. plantarum* OHV87 viability was determined as titer after the growth on MRS agar. **Results.** For the first time the optimal storage conditions for the mixture of *L. plantarum* ONU87 live cells and *E. carotovora* OHV320 carotovoricines were determined. The negative influence of *L. plantarum* ONU87 strain on the activity of carotovoricine mixture component was shown, if it was stored at temperature 20 and 4 °C. **Conclusions.** The decrease of carotovoricines activity after the storage at 4 and 20 °C with lactobacilli possibly occurs because of destabilization of proteins that form defective phage tails and theirs selfcontraction. **Key words:** storage, phytopathogens, bacteriocins, *Erwinia carotovora*, *Lactobacillus plantarum*.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Casas I. A., Dobrogosz W. J. Validation of probiotic concept: *Lactobacillus reuteri* confers broad-spectrum protection against disease in humans and animals. // Microb. Ecol. Health Dis. – 2000. – 38 p.
2. Witzernath M. Time for tailored antimicrobials: adapted bacteriophages in the ICU // Crit Care Med. – 2015. – Vol. 43, № 6. –p. 1346– 1347.
3. Gill J., Hollyer T. and Sabour M. Bacteriophages and phage-derived products as antibacterial therapeutics // Expert opinion on therapeutic patents. – 2007. – Vol. 17, № 11. – P. 1341– 1350.
4. Товкач Ф.И. Дефектная лизогения *Erwinia carotovora* / Ф.И. Товкач // Микробиология.– 2002.– Т. 71, № 3. – С. 359–367.
5. Ravensdale M., Blom T.J., Gracia-Garza J.A., Svircev A.M., and Smith R.J. Bacteriophages and the control of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* // Canadian J. of Plant Path. – 2007. – 29, № 2. – P. 121–130.
6. Limanska N., Ivanytsia T., Basiul O., Krylova K., Biscola V., Chobert J.-M., Ivanytsia V., Haertle T. Effect of *Lactobacillus plantarum* on germination and growth of tomato seedlings // Acta Physiologiae Plantarum. – 2013. – Vol. 35, № 5. – P. 1587–1595.
7. Сергеева Ж.Ю., Крилова К.Д., Ліманська Н.В., Васильєва Н.Ю., Товкач Ф.І., Іваниця В.О. Вплив *Lactobacillus plantarum* ONU 87 та автолізу бактерій *Erwinia carotovora* ZM1 на інфекційність збудників м'якої гнилі // Мікробіологія і біотехнологія. – 2012. – № 4 (20). – С. 16–28.
8. Сергеева Ж.Ю., Крилова К.Д., Ліманська Н.В., Васильєва Н.Ю., Іваниця В.О., Товкач Ф.І., Басюл О.В., Коротаєва Н.В. «Спосіб захисту коренеплодів та бульб від м'якої гнилі з використанням лактобацил та автолізу ервінії». Патент України на корисну модель Патент України на корисну модель № 82922. – Оpubл. 27.08.2013. – 4 с.
9. Korotaeva N.V., Kondratiuk T.V., Basiul O.V., Krylova K.D., Yamborko G.V., Ivanytsia V.O., Limanska N.V. Effect of *Lactobacillus plantarum* ONU 87 in mixture



with autolysate of erwinias on formation of tumors caused by *Rhizobium radiobacter* C58 // *Microbiology and Biotechnology*. – 2013. – Vol. 22, № 2. – P. 6–14.

10. Головач Т.М., Л.І. Грома. Лактобацили: заморожування при низьких та ультранизьких температурах Методи одержання чистих культур мікроорганізмів та їх довгострокового зберігання в колекціях. – К.: Тов. «Знання України». – 2004. – С. 39–44.

11. Крылова Е. Д. Характеристика колиспецифических бактериоцинов *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ЕС 153 // *Мікробіологічний журнал*. – 2009. – № 3. – С. 25–30.

12. Limanska N., Korotaeva N., Biscola V., Ivanytsia T., Merlich A., Franco BDGM, Chobert G. M., Ivanytsia V. and Haertlé T. Study of potential application of lactic acid bacteria in the control of infection caused by *Agrobacterium tumefaciens* // *Plant Pathology & Microbiology*. – 2015. – V.6, Issue 8. – P. 1–9.

13. Ліманська Н.В., Мерліч А.Г., Іваниця В.О. Поширення *Lactobacillus plantarum* у ферментованому рослинному матеріалі з України і Франції // *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*. – 2016. – Т. 74. – С. 169–174.

References

1. Casas I A., Dobrogosz W J. Validation of probiotic concept: *Lactobacillus reuteri* confers broad-spectrum protection against disease in humans and animals. *Microb. Ecol. Health Dis.*, 2000. 38.

2. Witzenrath M. Time for tailored antimicrobials: adapted bacteriophages in the ICU *Crit Care Med.*, 2015;(6):1346– 1347.

3. Gill J, Hollyer T and Sabour M. Bacteriophages and phage-derived products as antibacterial therapeutics. *Expert opinion on therapeutic patents*, 2007;(11):1341–1350.

4. Tovkach FI. Defective lysogeny of *Erwinia carotovora*. *Microbiology*, 2002, 71;(3):359 – 367.

5. Ravensdale M, Blom TJ, Gracia-Garza JA., Svircev AM, and Smith RJ. Bacteriophages and the control of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Canadian J. of Plant Path.*, 2007;(29):121–130.

6. Limanska N, Ivanytsia T, Basiul O, Krylova K, Biscola V, Chobert J-M, Ivanytsia V, Haertle T. Effect of *Lactobacillus plantarum* on germination and growth of tomato seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2013;(35):1587-1595.

7. Sergeeva Zh U, Krylova K D, Limanska N V, Vasylieva N U, Tovkach F I, Ivanytsia VO. Influence of *Lactobacillus plantarum* ONU 87 and autolysate of bacteria *Erwinia carotovora* ZM1 on the soft rot causative agent infectivity. *Microbiology and virology*, 2012;(4):16 – 28.

8. . MBI A 01 N 63/00. Protective method against soft rot in tubers and roots using lactobacilli and erwinia's autolysate. Sergeeva Zh U, Krylova K D, Limanska N V, Vasylieva N U, Tovkach F I, Ivanytsia V O, Basiul O V, Korotaeva N V – N 82922; zayavl. 03.01.2013; opubl. 27.08.2013.

9. Korotaeva NV, Kondratiuk T V, Basiul OV, Krylova KD, Yamborko GV, Ivanytsia VO, Limanska NV. Effect of *Lactobacillus plantarum* ONU 87 in mixture



АНТИМІКРОБНА АКТИВНІСТЬ ДО ЗБУДНИКА М'ЯКОЇ ГНИЛІ ...

with autolysate of erwinias on formation of tumors caused by Rhizobium radiobacter C58. Microbiology and Biotechnology, 2013;(22,):6 – 14.

10. Golovach TM, Groma LI Lactobacillus: freezing under low and ultralow tempratures. Pure culture obtaining methods and long preservation in collections, 2004:39-44.

11. Krylova KD. Characteristic of the colispecific bacteriocines of Erwinia carotovora subsp. carotovora EC 153. Microbiology journal, 2009;(3):25 – 30.

12. Limanska N, Korotaeva N, Biscola V, Ivanytsia T, Merlich A., Franco BDGM, Chobert GM, Ivanytsia V and Haertlé T. Study of potential application of lactic acid bacteria in the control of infection caused by Agrobacterium tumefaciens. Plant Pathology & Microbiology, 2015;(6):1 – 9.

13. Limanska NV, Merlich AG, Ivanytsia VO. Lactobacillus plantarum spread in fermented plants from Ukraine and France. Vistnyk of Lviv university. Biologycal section. 2016;(74):169 – 174.

Стаття надійшла до редакції 22.11.2016 р.

