

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

МУШИНСЬКА ВІКТОРІЯ СТАНІСЛАВІВНА

УДК 579.864.1:577.21:579.26:543.544:615.33:612.015.11

**ДИСЕРТАЦІЯ**

**ГЕНОМНА ТА ФУНКЦІОНАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА  
ПРОБІОТИЧНОГО ПОТЕНЦІАЛУ ШТАМУ *ENTEROCOCCUS* SP. SB12**

СПЕЦІАЛЬНІСТЬ 091 – «БІОЛОГІЯ»

ГАЛУЗЬ ЗНАНЬ 09 – «БІОЛОГІЯ»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

\_\_\_\_\_ Вікторія МУШИНСЬКА

Наукові керівники: Оксана ШТАПЕНКО, доктор біологічних наук

Василь СІРВАТКА, кандидат біологічних наук

## АНОТАЦІЯ

### **Мушинська В. С. Геномна та функціональна характеристика пробіотичного потенціалу штаму *Enterococcus* sp. SB12.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії 091 – «Біологія» (09 – «Біологія»). Інститут біології тварин НААН, Львів, 2026.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню геномних, біотехнологічних та функціональних властивостей штаму *Enterococcus* sp. SB12, ізольованого з традиційної овечої бринзи регіону Українських Карпат, а також оцінці його пробіотичного потенціалу, безпечності та впливу на мікробіом й оксидантно-антиоксидантний статус організму лабораторних тварин.

Молочнокислі бактерії є важливими компонентами кишкового мікробіому людини і тварин та відіграють ключову роль у підтриманні гомеостазу організму, регуляції метаболізму, формуванні імунної відповіді та забезпеченні колонізаційної резистентності шлунково-кишкового тракту. Крім фізіологічного значення, молочнокислі бактерії мають вагомe біотехнологічне та промислове значення, оскільки широко застосовуються у виробництві ферментованих харчових продуктів, пробіотичних препаратів, функціональних кормових добавок та біологічно активних речовин. У сучасних дослідженнях особлива увага приділяється пошуку нових штамів молочнокислих бактерій із природних та малодосліджених екологічних ніш, що можуть характеризуватися унікальними метаболічними та адаптивними властивостями.

Серед представників молочнокислих бактерій особливе місце займають ентерококи, які поєднують значний біотехнологічний потенціал, проте, потребують ретельної оцінки їх безпечності. Окремі штами *Enterococcus* spp. активно використовуються у виробництві ферментованих продуктів та розглядаються як перспективні пробіотики завдяки здатності синтезувати бактеріоцини, пригнічувати ріст патогенних мікроорганізмів та модулювати мікробіом кишечника. Водночас ентерококи можуть бути носіями генів антибіотикорезистентності, патогенності та факторів вірулентності, що потребує

комплексного геномного та функціонального аналізу штамів-кандидатів перед їх можливим практичним використанням.

Завдяки розвитку сучасних молекулярно-генетичних технологій, зокрема повногеномного секвенування, порівняльної геноміки та біоінформатичного аналізу, стало можливим здійснювати комплексне дослідження генетичної організації пробіотичних штамів, виявляти гени, пов'язані зі стійкістю до стресових факторів, синтезом біоактивних сполук та інших корисних властивостей для організмів тварин та людини. У зв'язку з цим актуальним є дослідження нових природних ізолятів ентерококів, здатних поєднувати біотехнологічний потенціал, антагоністичну активність і відсутність виражених патогенних властивостей.

Метою роботи було дослідити геномні, фізіолого-біохімічні та пробіотичні властивості штаму *Enterococcus* sp. SB12, оцінити його безпечність, антагоністичний потенціал, стійкість до факторів шлунково-кишкового тракту, вплив на мікробіом кишечника та оксидативний статус лабораторних тварин.

На першому етапі дослідження проведено секвенування та біоінформатичний аналіз геному штаму *Enterococcus* sp. SB12. Встановлено, що геном штаму представлений кільцевою хромосомою та двома плазмідами і характеризується наявністю численних мобільних генетичних елементів, профагових ділянок та CRISPR-системи, що свідчить про динамічність геному та потенційну здатність до горизонтального переносу генів. Функціональна анотація геному показала переважання генів, пов'язаних із процесами реплікації, транскрипції, трансляції, репарації ДНК, а також транспорту та метаболізму вуглеводів, що вказує на високу метаболічну гнучкість та адаптивність штаму.

У геномі *Enterococcus* sp. SB12 було виявлено гени, асоційовані зі стійкістю до антибіотиків, патогенністю та факторами вірулентності. Проте, фенотиповий аналіз показав високу чутливість штаму до ключових медичних антибіотиків, зокрема ампіциліну та ванкоміцину, що свідчить про відсутність функціональної реалізації більшості виявлених детермінант антибіотикорезистентності. Встановлено, що значна частина ідентифікованих

генів вірулентності бере участь у процесах адгезії, колонізації, адаптації до стресових умов та формуванні біоплівки, що характерно також для коменсальних і пробіотичних ентерококів.

Дослідження здатності штаму до синтезу біогенних амінів показало відсутність продукції гістаміну та путресцину, а також лише незначний рівень утворення тираміну, що свідчить про низький токсикологічний ризик використання *Enterococcus* sp. SB12 у складі ферментованих харчових продуктів.

У геномі штаму ідентифіковано кластери генів, пов'язані з основними шляхами первинного метаболізму, деградацією галової кислоти, синтезом бактеріоцинів та вторинних метаболітів. Зокрема, виявлено гени синтезу ентероцину А, ентероцину Р, ентероцину SE-K4, ентероцину L50 та ентеролізину А, а також кластер полікетидсинтаз III типу. Встановлено, що штам *Enterococcus* sp. SB12 проявляє виражену антагоністичну активність щодо грампозитивних і грамнегативних бактерій, яка може бути пов'язаною з продукцією комплексу бактеріоцинів та інших антимікробних метаболітів.

Філогенетичний та порівняльний геномний аналіз показав спорідненість штаму SB12 із ентерококами, ізольованими з ферментованих молочних продуктів, а також із промисловими пробіотичними штамами *Enterococcus faecium*. Встановлено, що геномна архітектура *Enterococcus* sp. SB12 значно відрізняється від патогенних клінічних штамів ентерококів і характеризується меншою кількістю мобільних генетичних елементів, генів вірулентності та антибіотикорезистентності.

На другому етапі досліджень проведено оцінку стійкості штаму *Enterococcus* sp. SB12 до факторів шлунково-кишкового тракту та технологічних умов культивування. Встановлено помірну стійкість штаму до дії лізоциму та високу виживаність при рН 3,0, що свідчить про його здатність виживати в умовах шлунково-кишкового тракту. Також показано здатність *Enterococcus* sp. SB12 витримувати температуру до 50 °С та концентрацію NaCl до 5%, що вказує на перспективність його використання у промислових технологіях виробництва ферментованих продуктів.

Дослідження ростових характеристик показало, що оптимальним середовищем для культивування штаму є середовище MRS, а найбільш інтенсивне накопичення біомаси відбувається за нейтральних та слабколужних значень рН. Окрім цього, було встановлено наявність антимікробної активності штаму *Enterococcus* sp. SB12 щодо типових патогенних мікроорганізмів.

Третій етап дослідження включав MALDI-TOF мас-спектрометричний аналіз антимікробних метаболітів та ВЕРХ-МС дослідження метаболічного потенціалу штаму, зокрема його здатності до синтезу антибіотиків, вітамінів і амінокислот. Встановлено, що штам *Enterococcus* sp. SB12 здатний синтезувати вітаміни групи В та вітамін С. MALDI-TOF аналіз підтвердив наявність пептидних сполук, однак не дозволив остаточно ідентифікувати продукти експресії бактеріоцинових кластерів, що може бути пов'язано з фазозалежною експресією генів, низькою концентрацією метаболітів або необхідністю посттрансляційної модифікації пептидів.

На четвертому етапі дослідження проведено експеримент *in vivo* на лабораторних мишах з метою оцінки впливу штаму *Enterococcus* sp. SB12 на мікробіом кишечника та прояв пробіотичних властивостей. Для цього були сформовані контрольна та дослідна групи мишей по 10 тварин у кожній групі. Тваринам дослідної групи вводили штам *Enterococcus* sp. SB12. Метагеномний аналіз показав здатність штаму колонізувати шлунково-кишковий тракт тварин. Встановлено, що введення SB12 супроводжувалося збільшенням частки представників корисної мікрофлори та зменшенням кількості опортуністичних мікроорганізмів, зокрема представників *Desulfovibrionaceae*, *Desulfovibrio* та *Helicobacter* spp. Також виявлено зниження різноманіття грибової складової кишкової мікробіоти, що може вказувати на стабілізацію мікробного балансу кишечника.

На завершальному етапі дослідження проведено оцінку фізіолого-біохімічних показників лабораторних мишей після введення штаму *Enterococcus* sp. SB12. Встановлено відсутність негативного впливу штаму на показники ліпідного, вуглеводного та білкового обміну. Дослідження параметрів

оксидантно-антиоксидантного статусу показало, що введення *Enterococcus* sp. SB12 не спричиняло розвитку системного оксидативного стресу та не порушувало редокс-гомеостаз організму тварин. Встановлено тенденцію до зниження вмісту гідроперекисів ліпідів у тканинах печінки та кишечника, що свідчить про потенційний антиоксидантний ефект досліджуваного штаму. Водночас рівень ТБК-активних продуктів, показники окисної модифікації білків та активність каталази залишалися в межах контрольних значень, що підтверджує відсутність прооксидантного впливу *Enterococcus* sp. SB12 та свідчить про його біологічну безпечність.

Отримані результати вказують, що штам *Enterococcus* sp. SB12 характеризується поєднанням пробіотичних, антагоністичних та технологічно цінних властивостей, здатністю позитивно впливати на мікробіом кишечника та підтримувати редокс-гомеостаз організму без проявів токсичності чи патогенності. Комплексний геномний, мікробіологічний, фізіолого-біохімічний та метагеномний аналіз дозволяє розглядати штам *Enterococcus* sp. SB12, як перспективний об'єкт для подальших досліджень і потенційного використання у виробництві пробіотичних препаратів та ферментованих харчових продуктів.

**Ключові слова:** *Enterococcus* sp., пробіотичні властивості, мікроорганізми, карпатський овечий сир, біоінформатичний аналіз, геном, біологічно активні речовини, оксидативний стрес, біохімічні параметри, каталаза, ТБК-активні продукти, гідроперекиси ліпідів, окисна модифікація білків, лабораторні тварини.

## ABSTRACT

### **Mushynska V. S. Genomic and functional characterization of the probiotic potential of the *Enterococcus* sp. SB12 strain.**

Thesis for the degree of Doctor of Philosophy 091 - «Biology» (09 - «Biology»)  
Institute of Animal Biology of the National Academy of Agrarian Science, Lviv, 2026.

This dissertation is devoted to the study of the genomic, biotechnological, and functional properties of *Enterococcus* sp. SB12, isolated from traditional sheep brynza cheese from the Ukrainian Carpathians, as well as to the evaluation of its probiotic potential, safety, and effects on the microbiota and redox status of laboratory animals.

Lactic acid bacteria are important components of the human and animal gut microbiota and play a key role in maintaining the body's homeostasis, regulating metabolism, shaping the immune response, and ensuring the colonization resistance of the gastrointestinal tract. In addition to their physiological significance, lactic acid bacteria are of considerable biotechnological and industrial importance, as they are widely used in the production of fermented foods, probiotic preparations, functional feed additives, and biologically active compounds. In current research, increasing attention is being paid to the search for new strains of lactic acid bacteria from natural and poorly studied ecological niches that may possess unique metabolic and adaptive properties.

Among lactic acid bacteria, enterococci occupy a special place, combining significant biotechnological potential with the need for a thorough assessment of their safety. Some strains of *Enterococcus* spp. are actively used in the production of fermented foods and are considered promising probiotics due to their ability to synthesize bacteriocins, inhibit the growth of pathogenic microorganisms, and modulate the gut microbiota. At the same time, enterococci may carry genes for antibiotic resistance, pathogenicity, and virulence factors, which requires comprehensive genomic and functional analysis of candidate strains prior to their potential practical application.

Thanks to advances in modern molecular genetic technologies, particularly whole-genome sequencing, comparative genomics, and bioinformatics analysis, it has

become possible to conduct comprehensive studies of the genetic organization of probiotic strains, identify genes associated with resistance to stress factors, the synthesis of bioactive compounds, the ability to colonize, and safety for the host organism. In this context, it is relevant to study new natural isolates of enterococci capable of combining technological suitability, antagonistic activity, and the absence of pronounced pathogenic properties.

The aim of this study was to investigate the genomic, physiological-biochemical, and probiotic properties of *Enterococcus* sp. SB12, to assess its safety, antagonistic potential, resistance to gastrointestinal factors, as well as its effect on the gut microbiota and the oxidative-antioxidant status of laboratory animals.

In the first stage of the study, the genome of the *Enterococcus* sp. SB12 strain was sequenced and subjected to bioinformatics analysis. It was established that the strain's genome consists of a circular chromosome and two plasmids and is characterized by the presence of numerous mobile genetic elements, prophage regions, and a CRISPR system, indicating the genome's dynamism and its potential capacity for horizontal gene transfer. Functional annotation of the genome revealed a predominance of genes associated with replication, transcription, translation, DNA repair, as well as carbohydrate transport and metabolism, indicating high metabolic flexibility and adaptability of the strain.

Genes associated with antibiotic resistance, pathogenicity, and virulence factors were identified in the *Enterococcus* sp. SB12 genome. However, phenotypic analysis revealed high sensitivity of the strain to major antibiotics, particularly ampicillin and vancomycin, indicating the absence of functional expression of most of the identified antibiotic resistance determinants. It was found that a significant portion of the identified virulence genes are involved in the processes of adhesion, colonization, adaptation to stressful conditions, and biofilm formation, which is also characteristic of commensal and probiotic enterococci.

An investigation into the strain's ability to synthesize biogenic amines revealed no formation of histamine or putrescine and showed only a negligible level of tyramine

formation, indicating a low toxicological risk associated with the use of *Enterococcus* sp. SB12 in fermented food products.

Gene clusters associated with the main pathways of primary metabolism, the degradation of halogenated acids, and the synthesis of bacteriocins and secondary metabolites were identified in the strain's genome. In particular, genes encoding enterocin A, enterocin P, enterocin SE-K4, enterocin L50, and enterolysin A were identified, as well as a type III polyketide synthase cluster. It has been established that the *Enterococcus* sp. SB12 strain exhibits pronounced antagonistic activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, which may be associated with the production of a complex of bacteriocins and other antimicrobial metabolites.

Phylogenetic and comparative genomic analysis showed that strain SB12 is closely related to *Enterococcus* species isolated from fermented dairy products, as well as to commercial probiotic strains of *Enterococcus faecium*. It was established that the genomic architecture of *Enterococcus* sp. SB12 differs significantly from that of pathogenic clinical enterococcal strains and is characterized by a lower number of mobile elements, virulence genes, and antibiotic resistance genes.

In the second stage of the study, the resistance of the *Enterococcus* sp. SB12 strain to gastrointestinal factors and technological cultivation conditions was evaluated. Moderate resistance of the strain to lysozyme and high survival at pH 3.0 were established, indicating its ability to survive in the gastrointestinal tract. It was also demonstrated that *Enterococcus* sp. SB12 withstands temperatures up to 50 °C and NaCl concentrations up to 5%, indicating its potential for use in industrial technologies for the production of fermented products.

A study of growth characteristics showed that the optimal medium for culturing the strain is MRS medium, and the most intensive biomass accumulation occurs at neutral and slightly alkaline pH values. In addition, the antimicrobial activity of the *Enterococcus* sp. SB12 strain against common pathogenic microorganisms was demonstrated.

The third stage of the study involved MALDI-TOF mass spectrometric analysis of antimicrobial metabolites and HPLC-MS analysis of the strain's metabolic potential,

specifically its ability to synthesize antibiotics, vitamins, and amino acids. It was established that the *Enterococcus* sp. SB12 strain is capable of synthesizing B vitamins and vitamin C. MALDI-TOF analysis confirmed the presence of peptide compounds; however, it did not allow for the definitive identification of the products of bacteriocin cluster expression, which may be associated with phase-dependent gene expression, low metabolite concentrations, or the need for post-translational modification of peptides. In the fourth stage of the study, an in vivo experiment was conducted on laboratory mice to evaluate the effect of the *Enterococcus* sp. SB12 strain on the gut microbiome and the manifestation of its probiotic properties. For this purpose, control and experimental groups of mice were formed, each consisting of 10 animals. The animals in the experimental group were administered the *Enterococcus* sp. SB12 strain. Metagenomic analysis demonstrated the strain's ability to colonize the animals' gastrointestinal tract. It was found that administration of SB12 was accompanied by an increase in the proportion of beneficial microflora and a decrease in the number of opportunistic microorganisms, particularly members of the *Desulfovibrionaceae* family, *Desulfovibrio*, and *Helicobacter* spp. A reduction in the diversity of the fungal component of the intestinal microbiota was also observed, which may indicate stabilization of the intestinal microbial balance.

In the final stage of the study, physiological and biochemical parameters of laboratory mice were assessed following administration of the *Enterococcus* sp. SB12 strain. No negative effect of the strain on lipid, carbohydrate, and protein metabolism parameters was observed. Analysis of oxidative-antioxidant status parameters showed that administration of *Enterococcus* sp. SB12 did not induce systemic oxidative stress and did not disrupt the redox homeostasis of the animals.

The results obtained indicate that the *Enterococcus* sp. SB12 strain is characterized by a combination of probiotic, antagonistic, and technologically valuable properties, as well as the ability to positively influence the gut microbiota and maintain the body's redox homeostasis, without exhibiting any toxicity or pathogenicity. Comprehensive genomic, microbiological, physiological-biochemical, and metagenomic analysis suggests that *Enterococcus* sp. SB12 is a promising candidate

for further research and potential use in the production of probiotic preparations and fermented food products.

**Keywords:** *Enterococcus* sp., probiotic properties, microorganisms, Carpathian sheep cheese, bioinformatic analysis, genome, biologically active substances, oxidative stress, biochemical parameters, catalase, TBA-reactive products, lipid hydroperoxides, oxidative protein modification, laboratory animals.

## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

**Наукові праці, в яких опубліковано основні наукові результати дисертації**

*Статті у наукометричних базах даних Scopus:*

1. Mushynska, V., Roman, I., Tistechok, S., Slyvka, I., Tsisaryk, O., Gromyko, O., Shtapenko, O., & Syrvatka, V. (2024). Draft genome sequence of *Enterococcus* sp. SB12 isolated from artisanal cheese of the Carpathian. *Microbiology resource announcements*, 13(1), e0086523. <https://doi.org/10.1128/MRA.00865-23>. Квартиль – Q3. (Дисертанткою особисто проведено лабораторні дослідження, матеріали до друку підготовлено у співавторстві).
2. Mushynska, V., Tistechok, S., Roman, I., Slyvka, I., Tsisaryk, O., Gromyko, O., Shtapenko, O., & Syrvatka, V. (2025). Genome Analysis and Characterization of *Enterococcus* sp. SB12 Isolated from Carpathian Artisanal Cheese. *Current microbiology*, 82(8), 349. <https://doi.org/10.1007/s00284-025-04337-4>. Квартиль – Q2. (Дисертантка брала участь у виконанні експериментальної частини дослідження, матеріали до друку підготовлено у співавторстві).

*Публікації у наукових фахових виданнях України*

3. Мушинська В. С., Сирватка В. Я., Штапенко О. В. (2026). Вплив довготривалого введення штаму *Enterococcus* sp. SB12 на показники оксидативного стресу мишей. *Біологія тварин*, 28(1), 56-61. <https://doi.org/10.15407/animbiol28.01.056>. (Дисертантка брала участь у виконанні експериментальної частини дослідження, матеріали до друку підготовлено у співавторстві).

**Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:**

4. Мушинська В., Роман І., Тістечок С., Громико О., Цісарик О., Сливка І., Штапенко О., Сирватка В. Аналіз послідовності чернетки геному ізоляту *Enterococcus* sp. SB12. (2023, 18-19 травня). Тези доповідей XXI Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених, присвяченої 100-річчю від дня

народження доктора біологічних наук, професора Василя Юхимовича Шавкуна: «Біологія тварин», Львів, Україна, ст. 69.

5. Mushynska V., Tistechok S., Slyvka, I., Tsisaryk O., Gromyko O., Shtapenko O., Syrvatka V. (2023, November 15<sup>th</sup>-16<sup>th</sup>). The effect of low pH and high temperatures on the survival of *Enterococcus* sp. SB12 strain. The International Scientific and Practical Conference «Modern aspects of microbiology, virology and biotechnology in wartime and post-war period»: abstract book, Kyiv, Ukraine, P.157-158.

6. Кукуян С., Мушинська В., Громико О., Тістечок С., Штапенко О., Сирватка В. (2024, 18-20 квітня).). Пробиотична дія *Enterococcus faecium* SB-12 на організм мишей. *Збірник тез XX Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ в біології», присвяченої 90-річчю від дня народження професора Ореста Демківа*, м. Львів, Україна, ст. 150-152.

7. Мушинська В., Тістечок С., Роман І., Громико О., Штапенко О., Сирватка В. (2024, 19-20 вересня). Вплив Штаму *Enterococcus* sp. SB12 на мікробіом кишківника мишей. *Тези доповідей XXII Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених, присвяченої 75-річчю від дня народження доктора ветеринарних наук, професора, члена-кореспондента НААН Ростислава ФЕДУРУКА (11.08.1949 — 21.06.2023): «Біологія тварин»*, м. Львів, Україна, ст. 159.

8. Mushynska V., Tistechok S., Gromyko O., Shtapenko O., Syrvatka V. (2024, November 19<sup>th</sup>-20<sup>th</sup>). Determining the optimum pH for cultivation *Enterococcus* sp. SB12 strain in industry. *The V Scientific Conference of Young Researchers «Youth and Modern Problems of Microbiology and Virology: abstract book*, Kyiv, Ukraine, P.31.

9. Кукуян С., Мушинська В., Громико О., Тістечок С., Штапенко О., Сирватка В. (2025, 14-15 травня). Порівняльний аналіз геномів штаму *Enterococcus* sp. SB12 та штамів *Enterococcus faecium*, виділених з молочнокислих продуктів. *Матеріали міжнародної наукової конференції «Актуальні питання біотехнології, екології та природокористування»*, м. Харків, Україна, ст. 72-73.

10. Mushynska V., Tistechok S., Gromyko O., Shtapenko O., Syrvatka V. (2025, May 15<sup>th</sup>-16<sup>th</sup>). Investigation of biogenic amine production by the *Enterococcus* sp. SB12 strain. *Materials of XXIII All-Ukrainian Scientific and Practical Conference of Young Scientists dedicated to the 110th anniversary of the Doctor of Biological Sciences, Professor, Honored Figure of Science and Technology of Ukraine Zenoviy SKORODYNSKYI (16.09.1915–10.04.1985) and to the 100th anniversary of the Doctor of Biological Sciences, Professor, Academician of the UAAS Fedir PALFIY (03.03.1925–31.12.1996): «The Animal Biology»*, Lviv, Ukraine, P. 62

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	19
ВСТУП.....	20
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	27
1.1. Загальна характеристика бактерій роду <i>Enterococcus</i> .....	27
1.1.1. Історія відкриття та еволюція класифікації роду <i>Enterococcus</i> .....	27
1.1.2. Морфологія та фізіологія ентерококів.....	28
1.1.3. Поширеність ентерококів у природних середовищах та харчових продуктах.....	29
1.2. Ентерококи як опортуністичні патогени.....	31
1.2.1. Епідеміологія інфекцій, спричинених ентерококами .....	31
1.2.2. Фактори патогенності та вірулентності.....	32
1.2.3. Антибіотикорезистентність ентерококів.....	36
1.3. Бактеріоцини: характеристика, потенціал та застосування в медицині та агропродовольчій промисловості.....	40
1.4. Технологічна роль та пробіотичний потенціал ентерококів, виділених з молочних продуктів.....	44
1.4.1. Поширеність представників роду <i>Enterococcus</i> в молочних та ферментованих продуктах.....	44
1.4.2. Метаболіти ентерококів та їх вплив на сенсорні властивості молочних продуктів.....	46
1.4.3. Вплив біоактивних сполук <i>Enterococcus</i> на здоров'я людини .....	47
1.4.4. Ентероцини як фактори модуляції мікробіоти ентерококами.....	49
1.4.5. Ентерококи як потенційні пробіотики.....	50
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	53
2.1. Матеріали досліджень.....	53
2.1.1. Штами мікроорганізмів.....	53

2.1.2.	Середовища та умови культивування.....	53
2.1.3.	Реактиви.....	54
2.2.	Експериментальні тварини.....	55
2.3.	Методи досліджень.....	56
2.3.1.	Виділення сумарної ДНК з <i>Enterococcus</i> sp. SB12 та повногеномне секвенування.....	56
2.3.2.	Біоінформатичні інструменти для аналізу геному.....	57
2.3.3.	Конструювання, секвенування та аналіз метагеномних даних.....	58
2.3.4.	Визначення антимікробної активності.....	59
2.3.5.	Визначення антибіотикорезистентності.....	59
2.3.6.	Визначення термостійкості.....	59
2.3.7.	Визначення солестійкості.....	60
2.3.8.	Визначення стійкості до лізоциму.....	60
2.3.9.	Визначення стійкості до різних значень рН середовища.....	61
2.3.10.	Виявлення здатності до продукування біогенних амінів.....	61
2.3.11.	Визначення оптимального рівня рН для культивування.....	61
2.3.12.	Визначення рівня холестерину ЛПВЩ, холестерину ЛПНЩ, глюкози, вмісту білка.....	62
2.3.13.	Визначення рівня гідропероксидів ліпідів.....	62
2.3.14.	Визначення окислювальної модифікації білків.....	62
2.3.15.	Визначення вмісту ТБК-активних продуктів.....	63
2.3.16.	Визначення активності каталази.....	63
2.3.17.	Екстракція та аналіз вторинних метаболітів.....	64
2.3.18.	Мас-спектрометричний аналіз бактеріоцинів методом MALDI-TOF.....	65
2.3.19.	Визначення продукції вітамінів та амінокислот штамом <i>Enterococcus</i> sp. SB12.....	65
2.3.20.	Дереплікація вторинних метаболітів.....	66
2.3.21.	Визначення активності екстрактів вторинних метаболітів....	67
2.3.22.	Статистичний аналіз.....	67

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	68
3.1. Характеристика геному штаму <i>Enterococcus</i> sp. SB12.....	68
3.1.1. Загальна та функціональна характеристика геному <i>Enterococcus</i> sp. SB12.....	68
3.1.2. Скринінг генів антибіотикорезистентності, патогенних генів та факторів вірулентності.....	76
3.1.3. Дослідження біосинтетичного потенціалу штаму <i>Enterococcus</i> sp. SB12.....	81
3.2. Порівняння та філогенетичний аналіз геному <i>Enterococcus</i> sp. SB12 з геномами інших штамів <i>Enterococcus faecium</i> .....	86
3.3. Експеримент <i>in vitro</i> : Мікробіологічна характеристика штаму <i>Enterococcus</i> sp. SB12.....	91
3.3.1. Оцінка виживання штаму SB12 у несприятливих умовах навколишнього середовища та підбір оптимальних параметрів для використання у промисловості .....	91
3.3.2. Оцінка безпеки та антагоністичних властивостей штаму SB12.....	95
3.4. Аналіз метаболічного потенціалу штаму <i>Enterococcus</i> sp. SB12.....	99
3.4.1. Вітамінний та амінокислотний склад біомаси <i>Enterococcus</i> sp. SB12.....	99
3.4.2. Аналіз екстрактів вторинних метаболітів.....	101
3.5. Експеримент <i>in vivo</i> : визначення впливу <i>Enterococcus</i> sp. SB12 на фізіологічні параметри мишей та здатність модулювати мікробіоту кишківника.....	105
3.5.1. Маса тіла та внутрішніх органів мишей після завершення експерименту.....	105
3.5.2. Метагеномний аналіз кишківника мишей за впливу <i>Enterococcus</i> sp. SB12.....	106

3.5.3. Вплив <i>Enterococcus</i> sp. SB12 на біохімічні параметри мишей.....	113
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	118
ВИСНОВКИ.....	138
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	141

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

- VRE (Vancomycin Resistant Enterococci) – ванкоміцин-резистентні ентерококи;
- RiPP (Ribosomally synthesized and Post-translationally modified Peptides) - рибосомально синтезовані та посттрансляційно модифіковані пептиди;
- LAB (Lactic Acid Bacteria) – молочно-кислі бактерії;
- QPS (Qualified Presumption of Safety) – кваліфікована презумпція безпеки;
- GRAS (Generally Recognized As Safe) – загально визнані як безпечні;
- ШКТ – шлунково-кишковий тракт;
- ЛПВЩ – ліпопротеїни високої щільності;
- ЛПНЩ – ліпопротеїни низької щільності;
- КУО – колонієутворюючі одиниці;
- ОМБ – окислювальна модифікація білків;
- ТБК – тіобарбітурова кислота;
- ГПЛ – гідроперекисне окиснення ліпідів;
- MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight) - матрично-активована лазерна десорбція/іонізація з часопротітним аналізатором;
- ВЕРХ-МС – високоефективна рідинна хроматографія;
- PKS (Polyketide Synthase) – полікетидсинтази.

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Використання пробіотиків у тваринництві та медицині, як безпечна та екологічно обґрунтована альтернатива антибіотикам є передовою стратегією в умовах глобального поширення антибіотикорезистентності. Сучасні уявлення про функціональні властивості пробіотичних мікроорганізмів змістили акцент з їх антагоністичних властивостей щодо патогенів на системну модуляцію метаболізму та підтримку гомеостазу господаря. Одним із ключових механізмів такого впливу є регуляція оксидантно-антиоксидантної рівноваги та зниження інтенсивності окисного стресу [88]. Пробиотичні мікроорганізми здатні нейтралізувати активні форми кисню завдяки синтезу антиоксидантних ензимів і низькомолекулярних захисних сполук, що визначає їхню потенційну біологічну безпечність та функціональну цінність [223].

Серед молочно-кислих бактерій особливу увагу привертає *Enterococcus faecium* – типовий представник кишкової мікробіоти ссавців, який характеризується високою стійкістю до кислотності шлункового соку, жовчних солей і температурних коливань. Важливою цінністю штамів *Enterococcus faecium* є здатність синтезувати біологічно активні сполуки, зокрема бактеріоцини (ентероцини) – рибосомно синтезовані антимікробні пептиди. Бактеріоцини можуть пригнічувати розвиток патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів, модулювати склад кишкового мікробіому та підсилювати потенціал штамів-продуцентів, водночас будучи безпечними для споживання продуктами білкового походження [87, 198, 199, 335].

Водночас ентерококи характеризуються подвійним біологічним значенням. Поряд з технологічною і пробіотичною цінністю окремі представники роду *Enterococcus* належать до опортуністичних патогенів і можуть бути носіями факторів вірулентності та антибіотикорезистентності. Відсутність для ентерококів статусів QPS і GRAS, а також значна штамова варіабельність генетичних детермінант безпечності зумовлюють необхідність

ретельної індивідуальної оцінки кожного ізоляту перед його потенційним застосуванням [185].

Отже, актуальність даного дослідження зумовлена необхідністю комплексної оцінки безпечності та функціонального потенціалу нових штамів *Enterococcus faecium* як перспективних пробіотичних агентів чи промислово важливих продуцентів. Комплексне дослідження від аналізу геному штаму через його функціональну та метаболічну оцінку до безпосереднього впливу на організм лабораторних тварин дозволяє не тільки довести безпечність його використання, а й оцінити його біотехнологічний потенціал та технологічні переваги в якості промислового продуцента для виробництва ферментованих продуктів.

#### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами.**

Дисертаційна робота виконана в лабораторії біотехнології відтворення Інституту біології тварин НААН та на базах Колекції мікробних культур продуцентів антибіотиків та кафедри генетики та біотехнології Львівського національного університету імені Івана Франка в рамках науково-дослідної роботи 43.00.02.10.П «Дослідити пробіотичний потенціал нового штаму бактерій *Enterococcus sp.* SB12 для підвищення адаптаційної здатності тварин до впливу кліматичних чинників» (номер державної реєстрації – 0124U001989) та 27.00.02.01 Ф «Молекулярно-генетичні основи використання біотехнологічних платформ антимікробної дії як альтернатива антибіотикам у тваринництві» (номер державної реєстрації – 0126U002014), а також виконання грантів UASEEDs\_P3\_CoD10\_12 «Biotechnological preparations - an alternative to antibiotics in animal husbandry» from Seeds of Bravery (UASEEDs) funded by the European Union under the European Innovation Council (EIC) та індивідуального гранту FEMS (Application ID 5385) за проектом «Ідентифікація та характеристика бактеріоцинів штаму *Enterococcus sp.* SB12 з антимікробним потенціалом».

**Мета дослідження.** Мета дисертаційної роботи полягала у визначенні пробіотичного потенціалу штаму *Enterococcus sp.* SB12 на основі комплексного аналізу його геному, оцінки метаболічної і функціональної активності, а також

експериментального підтвердження його безпечності й позитивного впливу на мікробіом і фізіолого-біохімічних показників організму лабораторних тварин *in vivo*.

**Для досягнення мети були визначені наступні завдання:**

- здійснити повногеномне секвенування, збірку та анотацію геному штаму *Enterococcus* sp. SB12 для верифікації його таксономічного положення та уточнення філогенетичних зв'язків у межах роду *Enterococcus*;
- провести біоінформатичний аналіз геному з метою ідентифікації кластерів генів вторинних метаболітів, антимікробних сполук (бактеріоцинів) та оцінки генетичної безпеки (пошук детермінант антибіотикорезистентності та факторів вірулентності);
- дослідити біотехнологічні та пробіотичні властивості штаму *in vitro*, зокрема його резистентність до екстремальних факторів (температури, солі, лізоциму) та здатність до виживання в умовах моделювання ШКТ;
- охарактеризувати метаболічний профіль штаму SB12 та ідентифікувати ключові біоактивні метаболіти з використанням методів високоефективної рідинної хроматографії з мас-спектрометрією (ВЕРХ-МС) та матрично-асистованої лазерної десорбції/іонізації – часу прольоту (MALDI-TOF);
- провести метагеномний аналіз складу мікробіому кишечника піддослідних тварин для з'ясування закономірностей впливу штаму SB12 на кількісне та якісне співвідношення представників кишкового мікробіоценозу;
- з'ясувати фізіолого-біохімічні ефекти тривалого застосування штаму *in vivo*, оцінивши стан оксидативно-відновного гомеостазу та стабільність метаболічних показників сироватки крові мишей.

**Об'єкт дослідження:** пробіотичний потенціал, генетичні детермінанти безпеки та метаболічна активність штаму *Enterococcus* sp. SB12.

**Предмет дослідження:** структурно-функціональна організація геному *Enterococcus* sp. SB12, склад генних кластерів бактеріоцинів, профіль біоактивних метаболітів та динаміка біохімічних і метагеномних показників організму піддослідних тварин за дії даного штаму.

**Методи дослідження:** молекулярно-генетичні (виділення ДНК, повногеномне секвенування на платформі *Illumina*, анотація та збірка геному штаму); біоінформатичні (філогенетична характеристика штаму, скринінг кластерів генів антимікробних сполук, ідентифікація генетичних детермінант безпеки та структурне моделювання біоактивних пептидів у спеціалізованих базах даних); мікробіологічні (оцінка виживання штаму за екстремальних умов рН та температури, визначення антагоністичної активності *in vitro*); фізико-хімічні (ідентифікація пептидів та метаболітів методами ВЕРХ, ВЕРХ-МС та MALDI-TOF); метагеномні (профілювання мікробіоти кишечника за секвенуванням гена 16S рРНК, аналіз таксономічного різноманіття); біохімічні (визначення показників ліпідного, вуглеводного та білкового обмінів; оцінка інтенсивності вільнорадикальних процесів та стану системи антиоксидантного захисту).

**Наукова новизна отриманих результатів.** Вперше здійснено комплексну характеристику та повногеномну анотацію нового штаму *Enterococcus* sp. SB12, виділеного з традиційної карпатської бринзи. На основі повногеномного секвенування (WGS) виявлено унікальний біосинтетичний потенціал штаму, що полягає у наявності розширеного набору з п'яти кластерів генів бактеріоцинів (ентероцини А, Р, SE-K4, L50a та ентеролізін А), які зумовлюють його високу антагоністичну активність щодо широкого спектра патогенних мікроорганізмів. Доведено генетичну безпеку штаму SB12 шляхом встановлення виключно хромосомної локалізації детермінант вірулентності та антибіотикорезистентності, що науково обґрунтовує мінімальний ризик горизонтального переносу генів резистентності в умовах кишкового мікробіому.

Уточнено таксономічний статус та філогенетичну спорідненість досліджуваного ізоляту з безпечними комерційними пробіотичними культурами,

а також ідентифіковано специфічні генетичні локуси (*efaA*, *WxL locus C*), що відповідають за його високу адаптивність до умов шлунково-кишкового тракту. Вперше із застосуванням метагеномного аналізу встановлено здатність штаму SB12 позитивно модулювати склад мікробіоти кишечника мишей, стимулюючи ріст здорового мікробіому кишківника та пригнічуючи розвиток умовно-патогенних бактерій.

Експериментально доведено біологічну інертність штаму *in vivo*, що підтверджується стабільністю метаболічних показників крові та збереженням оксидативно-відновного гомеостазу макроорганізму за умов тривалого застосування пробіотика. Отримані дані розширюють уявлення про механізми пробіотичної дії ентерококів та теоретично обґрунтовують перспективність використання штаму *Enterococcus* sp. SB12 як основи для створення нових функціональних препаратів.

**Практичне значення отриманих результатів.** Практичне значення роботи насамперед полягає в отриманні фундаментальних генетичних даних: повногеномну послідовність та детальний генетичний профіль штаму *Enterococcus* sp. SB12 депоновано у міжнародній базі даних NCBI, що відкриває можливості для їх використання у порівняльних геномних дослідженнях та ідентифікації нових бактеріоцинових локусів.

На основі цих даних науково обґрунтовано доцільність використання досліджуваного штаму як перспективної та безпечної генетичної основи для створення високоефективних пробіотичних препаратів. Зокрема, встановлена відсутність плазмідних детермінант резистентності дозволяє рекомендувати штаму SB12 для впровадження у тваринництво як екологічну альтернативу кормовим антибіотикам.

Технологічну цінність результатів підтверджує виявлена висока термотолерантність штаму, що дозволяє інтегрувати його у процеси виробництва гранульованих кормів без втрати біологічної активності. Разом з тим, доведена здатність штаму позитивно модулювати склад кишкової мікробіоти та підтримувати антиоксидантний статус макроорганізму *in vivo* є

підґрунтям для впровадження нових схем профілактики дисбіозів та зміцнення резистентності молодняка тварин.

Результати дисертаційного дослідження також можуть бути використані в навчальному процесі вищих навчальних закладів біологічного та ветеринарного профілів при підготовці курсів з мікробіології, біотехнології та фізіології тварин.

Основні результати та матеріали дисертаційної роботи впроваджено у навчальний процес Львівського національного університету імені І. Франка при викладанні дисципліни «Великий практикум».

**Особистий внесок здобувача.** Формування ідей, планування експериментів, аналіз та обговорення отриманих результатів, підготування рукописів статей та формування основних положень, виконувалося автором спільно з науковими керівниками д.б.н. Оксаною Штапенко та к.б.н. Василем Сирваткою. Увесь обсяг експериментальних робіт виконано автором самостійно або за безпосередньої участі. Спільно з науковими керівниками провела біохімічний аналіз показників зразків тканин та крові лабораторних мишей для оцінки впливу *Enterococcus* sp. SB12. Автор самостійно здійснила біоінформатичний та філогенетичний аналіз геному штаму SB12, дослідила антагоністичні, антибіотичні та мікробіологічні властивості, здійснила ВЕРХ-МС та MALDI-TOF аналіз хроматограм та проаналізувала метагеном кишківника лабораторних мишей. ВЕРХ-МС-аналіз вторинних метаболітів виконано в співпраці з к.б.н. М.Л. Мироновським й проф. А.М. Лужецьким (Саарландський університет, Німеччина). ВЕРХ-МС-аналіз первинних метаболітів, зокрема вітамінів та амінокислот було виконано в співпраці з к.б.н. Р.М. Остаповим (Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів та кормових добавок, Україна). MALDI-TOF аналіз виконано в співпраці з проф. Р. Мюлером (Гемгольц центр фармацевтичних досліджень, Німеччина). Пошук й аналіз наукової літератури за темою дисертації та її оформлення автор виконала самостійно.

**Апробація дисертації.** Результати досліджень та основні положення дисертаційної роботи доповідались на засіданнях вченої ради Інституту біології тварин НААН (2023-2025 рр.), міжнародних та всеукраїнських науково-

практичних конференціях, зокрема: XXI Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених «Біологія тварин» (18-19 травня 2023 р., м. Львів); Міжнародна науково-практична конференція «Modern aspects of microbiology, virology and biotechnology in wartime and post-war period» (15-16 листопада 2023 р., м. Київ); XX Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ в біології» (18-20 квітня 2024 р., м. Львів); Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених «Біологія тварин» (19-20 вересня 2024 р., м. Львів); V Наукова конференція молодих дослідників «Youth and Modern Problems of Microbiology and Virology» (19-20 листопада 2024 р., м. Київ); Міжнародна наукова конференція «Актуальні питання біотехнології, екології та природокористування» (14-15 травня 2025 р., м. Харків); XXIII Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених «Біологія тварин» (15-16 травня 2025 р., м. Львів).

**Публікації.** За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 10 наукових праць, у тому числі 2 наукові статті у фахових виданнях, які індексуються у міжнародних наукометричних базах даних Scopus з імпакт-фактором, 1 стаття у фаховому журналі категорії Б та 7 тез наукових доповідей.

**Структура та обсяг дисертації.** Основний зміст роботи викладено на 119 сторінках комп'ютерного тексту. Дисертаційна робота складається із анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, результатів власних досліджень, аналізу і узагальнення результатів досліджень, висновків, списку використаних джерел і додатків. Робота ілюстрована 27 рисунками та 9 таблицями. Список літератури містить 377 найменувань, з яких 372 латиницею.

## РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Загальна характеристика бактерій роду *Enterococcus*

#### 1.1.1. Історія відкриття та еволюція класифікації роду *Enterococcus*

Рід *Enterococcus* має відносно коротку історію основна частина якої тісно пов'язана зі стрептококами. Вперше термін «стрептокок» використав Білрот у 1874 році для опису коків, розташованих ланцюжками, які він спостерігав у ранах [36]. Десятиліттям пізніше стрептококи було виділено в окремий рід [300]. Перша згадка про ентерококів з'явилася у 1899 році, коли Тьєрселін і Жуо виділили сапрофітні, потенційно патогенні коки з людського кишечника, які тоді віднесли до роду *Streptococcus* під видовою назвою *faecalis* [9, 336].

З часом серологічні дослідження Лансфілда та класифікація Шермана дозволили виділити ентерококи як окрему групу «стрептококових ліній» [188, 320]. Остаточний статус окремого роду вони отримали лише у 1984 році завдяки роботам Шлейфера та Кілпер-Бальц, які віднесли грампозитивні кокки Лансфілдової групи D до нового роду *Enterococcus*, названого на честь Тьєрселін і Жуо. На той час до роду *Enterococcus* було віднесено лише два види — *Enterococcus faecalis* та *Enterococcus faecium* [313]. Подальші молекулярні дослідження 16S рРНК підтвердили відмінність ентерококів від стрептококів і дозволили чітко відокремити їх від роду *Lactococcus*, який також належить до родини *Streptococcaceae* [206, 312].

На сьогодні встановлено, що рід *Enterococcus* належить до родини *Enterococcaceae*, ряду *Lactobacillales*, класу *Bacilli*, типу *Firmicutes*, до домену *Bacteria* [313]. Наразі описано близько 60 видів цього роду [93], які поділяють на п'ять основних філогенетичних груп: *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. avium*, *E. gallinarum* та *E. cecorum* [45]. Поза офіційною номенклатурою ентерококи належать до молочнокислих бактерій (LAB) з вмістом G+C нижче 50% [285]. Таким чином, сучасне уявлення про рід *Enterococcus* сформувалося на основі

поєднання класичних мікробіологічних спостережень і молекулярно-біологічних даних, що підтверджують їхнє місце серед молочнокислих бактерій.

### 1.1.2. Морфологія та фізіологія ентерококів

Ентерококи – це грампозитивні коки, з вмістом GC-основ менше 40%, які виробляють молочну кислоту як основний кінцевий продукт ферментації глюкози. Клітини ентерококів зазвичай овальної форми, зустрічаються поодинокі, парами, або утворюють ланцюжки різної довжини [14, 59]. Вони не утворюють спор і капсул, хоча деякі види, наприклад *Enterococcus casseliflavus* та *Enterococcus gallinarum*, мають джгутик. Колонії ентерококів на стандартних агаризованих середовищах зазвичай молочно-білого кольору, проте деякі види (*E. sulfureus*, *E. casseliflavus* та *E. mundtii*) продукують каротиноїдні пігменти, що надають колоніям жовте забарвлення [82, 131, 193].

Більшість представників роду *Enterococcus* характеризуються пептидогліканом клітинної стінки типу лізин–D-аспарагін, що є типовою особливістю для більшості молочнокислих бактерій. Водночас *E. faecalis* становить виняток, оскільки містить пептидоглікан типу лізин–аланін. Ці відмінності в структурі пептидоглікану мають таксономічне значення та відображають еволюційні розбіжності всередині роду, а також можуть впливати на чутливість до певних ферментів, механіку клітинної стінки та особливості взаємодії бактерій з доквіллям [59, 66-69, 108, 313]. Клітинна стінка ентерококів не містить ліпідів чи білків, інтегрованих у її структуру, однак характеризується наявністю тейхоевих кислот, які виступають основними поверхневими антигенами. Ці полімери, ковалентно пов'язані з пептидогліканом, відіграють важливу роль у підтриманні структурної цілісності клітинної стінки, регуляції іонного гомеостазу та взаємодії бактерії з імунною системою господаря [13].

Ентерококи є факультативними анаеробами: вони здатні рости як за анаеробних, так і за аеробних умов [82, 317]. Толерантність до кисню забезпечується активністю ферменту супероксиддисмутази, яка каталізує перетворення токсичного супероксид-аніону на менш шкідливий пероксид;

синтез цього ферменту посилюється при контактi клітини з молекулярним киснем [120].

Ентерококи не здатні синтезувати порфірин, і, відповідно, позбавлені цитохромних пігментів, які відповідають за фотосинтез. Водночас окремі види продукують флавінвмісні NADH-пероксидази, які беруть участь у ферментативному метаболізмі, сприяють захисту клітини від окисного стресу та потенційно підсилюють вірулентність [28].

За типом живлення ентерококи є хемоорганотрофами та каталазонегативними мікроорганізмами; деякі види проявляють гемолітичну активність [304]. Метаболізм ентерококів належить до гомоферментативного типу. Основний шлях розщеплення глюкози – гліколіз (шлях Ембдена-Мейєргофа-Парнаса). На виході гліколізу утворюється піруват і його подальша метаболізація залежить від умов: в анаеробному або слабокислому середовищі (рН 5–6) піруват переважно відновлюється до лактату, а в аеробному або нейтрально-лужному середовищі глюкоза може частково перетворюватися на оцтову кислоту, ацетоїн і CO<sub>2</sub>, а піруват далі розщеплюється до форміату, етанолу, ацетату у співвідношенні 2 : 1 : 1 [304]. Піруват перетворюється на етанол і ацетат переважно тоді, коли в середовищі відчувається дефіцит поживних речовин [90].

Ентерококи здатні витримувати широкий температурний діапазон - від 10 до 45 °С, з оптимумом росту при 35 - 37°C [45]. Вони також переносять до 6,5% NaCl в середовищі, 22% етанолу, високі концентрації жовчних кислот або додецилсульфату натрію. Ентерококи характеризуються значною резистентністю до висихання, що сприяє їх виживанню в несприятливих умовах, зокрема в лікарняному середовищі [59, 157].

### **1.1.3. Поширеність ентерококів у природних середовищах та харчових продуктах**

Ентерококи здатні виживати в різноманітних середовищах завдяки високій адаптивності. Їхня здатність колонізувати широкий спектр екологічних ніш

пов'язана з еволюційною історією, що, за гіпотезою, розпочалася близько 500 млн років тому внаслідок терестризації тварин-господарів, які містили предків ентерококів [193]. На основі аналізу 16S рРНК вважається, що ентерококи походять від бактерій, близьких до роду *Vagococcus*, який належить до родини *Carnobacteriaceae*. Представники *Carnobacteria* та *Vagococcus* залишалися переважно асоційованими з морськими організмами [193], тоді як більшість ентерококів з часом адаптувалися до кишечника наземних тварин, зокрема, ссавців, птахів, рептилій і комах [193, 211, 242]. В результаті еволюції, представники цього роду окрім кишечника тварин заселили ґрунти [32, 325], поверхневі та стічні води (*E. moraviensis* та *E. haemoperoxidus*) [235], рослини [32, 241], лікарняні середовища [123], харчові продукти [30, 143] та корми [56, 264]. Вони також можуть бути присутніми у ферментованих молочних та м'ясних продуктах [193, 204]. Деякі види здатні існувати як епіфіти на рослинах – зокрема *E. mundtii*, *E. casseliflavus*, *E. faecalis* та *E. faecium* [211].

Новими відкриттям є вид *E. aquimarinus*, що мешкає в солоній воді [193] і його виживання у таких умовах є наочним прикладом адаптації ентерококів до середовища. Дослідження показали, що деякі види ентерококів можуть перебувати на зоопланктоні, який поширений як у прісних, так і в солоних водоймах. При цьому збільшення чисельності планктону в літні місяці супроводжується зростанням кількості ентерококів [323]. Крім того ентерококи були виявлені на березі прісноводного озера Мічиган (США) у висушених водоростях роду *Cladophora*, де вони виживали протягом шести місяців при температурі 4 °C разом з *Escherichia coli* [355].

Ентерококи є одними з найперших бактерій, які колонізують кишково-шлунковий тракт людей в перші дні життя. Зв'язок між цими бактеріями та кишковою мікрофлорою людини був встановлений ще у ранніх працях Тьерселіна і Жуо [336]. Подальші дослідження Лебретона та ін. [193] підтвердили, що ентерококи є типовими та стабільними представниками кишкової мікробіоти. Найпоширенішими видами в шлунково-кишковому тракті є *E. faecalis* та *E. faecium*, які одночасно є й основними патогенами серед бактерій

роду *Enterococcus* [193]. Ці види, а також *E. durans* та *E. hirae* досить часто зустрічаються у поверхневих та стічних водах, куди вони, ймовірно, потрапляють із фекаліями людей та тварин [193]. Тому кишкові бактерії, включаючи ентерококи, використовуються як фекальні індикатори для оцінки чистоти води [323].

Таким чином, ентерококи демонструють високу екологічну пластичність, здатність виживати в різноманітних водних середовищах та адаптуватися до несприятливих умов довкілля.

## **1.2. Ентерококи як опортуністичні патогени**

### **1.2.1. Епідеміологія інфекцій, спричинених ентерококами**

До того часу, як Тьєрселін і Жуо [336] застосували назву «ентерокок» до коків-коменсалів кишково-шлункового тракту, вже було задокументовано перший випадок інфекції людини, пов'язаної з цим родом. Проте ентерококів як проблемних та опортуністичних патогенів почали розглядати лише наприкінці 1970-х років [124].

Нозокоміальні інфекції – це інфекції, що розвиваються у пацієнтів під час перебування в медичному закладі. Становлення ентерококів як одних із провідних нозокоміальних патогенів пов'язане з їхньою тривалою еволюцією. [306]. Під час спільної еволюції з тваринами-господарям та адаптації до наземного існування, ентерококи набули здатності до обміну генетичною інформацією з іншими бактеріями, що мешкають у тих самих екологічних нішах, і сформували спрощені, пластичні геноми, які дозволяють їм адаптуватися навіть до дії антибіотиків у сучасних медичних закладах [193].

Манді та ін. [243] визначили 12 видів ентерококів, що найчастіше спричиняють інфекції у людини: *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. hirae*, *E. malodoratus*, *E. mundtii*, *E. pseudoavium*, *E. raffinosus* та *E. solitarius*. При цьому *E. faecalis* та *E. faecium* становлять приблизно 75 % від клінічних ізолятів [177] і належать до так званих патогенів ESKAPE-групи (*E. faecium*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter*

*baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* та *Enterobacter spp.*) - групи вірулентних, мультирезистентних мікроорганізмів, які є причиною більшості нозокоміальних інфекцій у людей [55, 57, 239]. Раніше *E. faecalis* займав перше місце серед клінічних ізолятів, проте сьогодні його роль дедалі частіше переймає *E. faecium*, зокрема через зростаючу резистентність до антибіотиків [14, 193]. Водночас все частіше повідомляється про інфекції, спричинені іншими видами ентерококів [124]. Проблеми з мультирезистентними ентерококами спершу фіксувалися переважно в лікарнях США, проте в останні десятиліття їхня поширеність значно зросла і в європейських медичних закладах, і тенденція до збільшення залишається актуальною [14].

Ентерококи, незважаючи на зростаюче значення як нозокоміальних опортуністів, не вважаються високовірулентними і зазвичай спричиняють захворювання лише у імунокомпрометованих господарів [124]. Вони переважно викликають інфекції м'яких тканин, сечовивідних шляхів, нозокоміальну бактеріємію та внутрішньочеревні інфекції; рідко – менінгіт або респіраторні інфекції [177]. При абсцесах ентерококи діють переважно разом з анаеробними мікроорганізмами, що робить такі інфекції відносно легко контрольованими антибіотиками [167].

Поширення ентерококів у лікарняному середовищі посилюється застосуванням антибіотиків проти грамнегативних бактерій, що знижує конкуренцію в мікробіоті господаря та сприяє росту грампозитивних видів. Додаткові фактори, що сприяють розвитку та поширенню, включають тривалу госпіталізацію, контакт із інфікованими пацієнтами та проведення трансплантацій органів або кісткового мозку.

### **1.2.2. Фактори патогенності та вірулентності**

Патогенність визначається як здатність мікроорганізму викликати захворювання у різних видів господарів і зумовлюється такими факторами, як трансмісивність, токсичність та інвазивність. Кількісною мірою патогенності є вірулентність, яка залежить від генів, локалізованих у хромосомі або на

плазмідах. Саме наявність таких генів на плазмідах забезпечує можливість горизонтального перенесення факторів патогенності між штамами і навіть різними видами бактерій, що призводить до появи більш вірулентних мікроорганізмів [107].

Види ентерококів, що мешкають у навколишньому середовищі, зазвичай характеризуються низьким рівнем вірулентності, однак набуття генів резистентності чи адгезивних та токсичних детермінант може перетворювати такі штами на клінічно значущі. До ключових чинників патогенності ентерококів належать природна резистентність до низки антибіотиків (кліндаміцину, цефалоспоринів, аміноглікозидів), здатність до акумуляції й передачі плазмід, що містять гени резистентності (зокрема до ванкоміцину), а також геномна пластичність, яка полегшує адаптацію до різних екологічних ніш [14, 193].

За класифікацією Чаєцької-Вержовської та співавт. [55] фактори вірулентності ентерококів поділяють на дві групи: поверхневі адгезивні білки, що забезпечують колонізацію, та секретовані ферменти й токсини, які пошкоджують тканини господаря. До першої групи належать агрегаційна речовина AS, колагензв'язувальні білки ACE (*E. faecalis*) та Acm (*E. faecium*), адгезин EfaA та поверхневий білок Esp. До секретованих факторів відносять цитолізін (Cyl), желатиназу (GelE) та гіалуронідазу (Hyl) [55].

Агрегаційна речовина (AS) належить до групи високо гомологічних адгезинів, що кодується великими плазмідами і забезпечують ефективну адгезію між бактеріями, сприяючи обміну плазмідами в межах феромонової системи ентерококів [311]. Це також полегшує поширення генів антибіотикорезистентності та інших факторів вірулентності, таких як цитолізін (*cyl*) [59]. Синергія AS і цитолізіну підсилює вірулентність штамів AS<sup>+</sup>/Cyl<sup>+</sup> [118, 167]. Генетичні детермінанти AS виявлені у ізолятах *E. faecalis* і *E. faecium*, причому клінічні штами *E. faecalis* демонструють їх частіше [13, 96, 103]. Наявність гена *asal* була зафіксована також в штамх *E. gallinarum* харчового походження [8].

Типовим прикладом дії агрегаційної речовини (AS) є передача плазмід рCF10 у *E. faecalis*, яка містить гени стійкості до антибіотиків, зокрема tetM, локалізований на транспозоні TN925. Плазміда також несе гени, що забезпечують феромонну відповідь, агрегацію, реплікацію, обробку ДНК та формування пар для кон'югації [94, 95, 360]. Патогенний процес розпочинається з адгезії клітин до тканин господаря, після чого активуються гени, що сприяють адаптації до окислювально-відновного стресу, дефіциту поживних речовин, впливу фагів та імунних механізмів. Ключову роль відіграє феромон — короткий гідрофобний пептид, який надходить від клітини-реципієнта та індукує агрегацію у клітини-донора, що несе конкретну плазмиду. Це спричиняє перебудову поверхні клітини-донора, формування клітинних кластерів і подальшу передачу плазмід [42].

Окрім участі в кон'югації, AS забезпечує адгезію до епітеліальних клітин кишечника, ниркових каналців та білків позаклітинного матриксу (ECM), а також сприяє формуванню біоплівки [59, 153]. Він підсилює захист проти імунних механізмів господаря: у *E. faecalis* - AS полегшує опсонін-незалежне зв'язування з нейтрофілами та підвищує виживання всередині макрофагів [168]. Водночас адгезія не є виключно ознакою вірулентності, адже як комменсали ентерококи повинні прикріплюватися до клітин кишечника, щоб уникати вимивання перистальтикою [55.]

ACE широко представлений у клінічних штаммах *E. faecalis* [179]. Він належить до групи поверхневих білків Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecules (MSCRAMM) і містить мотив LPXTG (лізин-пролін-будь-яка амінокислота-треонін-гліцин) [311, 55]. Основна функція ACE полягає в сприянні колонізації хазяїна шляхом зв'язування з колагеном I і IV типу та ламініном й розвитку таким чином інфекцій сечовивідних шляхів та ендокардиту. [179, 311]. ACE кодується геном *ace*; делеція якого знижує вірулентність *E. faecalis* і погіршує виживання бактерії всередині макрофагів. *E. faecium* має подібний білок ACm, який також зв'язується з колагеном, але на

відміну від ACE не взаємодіє з ламініном і проявляє більшу афінність до колагену I типу порівняно з колагеном IV типу [179].

EfaA вважається потенційним детермінантом вірулентності, який, ймовірно, сприяє адгезії ентерококів до клітин господаря [250] та може відігравати важливу роль при розвитку ендокардиту [116]. EfaA кодується геном *efaA<sub>fs</sub>* у штаммах *E. faecalis* та геном *efaA<sub>fm</sub>* у штаммах *E. faecium* [97].

Esp є найбільшим із відомих ентерококових поверхневих білків, асоційований з формуванням біоплівки [55], у межах яких бактерії виявляють підвищену антибіотикорезистентність, а також демонструють ефективніший обмін генетичним матеріалом [59,119]. Його структура подібна до білків інших грампозитивних бактерій, зокрема C-α та β-протеїнів *Streptococcus agalactiae*, R28 *Streptococcus pyogenes* і *Vap Staphylococcus aureus*. Ген *esp* локалізований на острові патогенності [354]. Його наявність корелює з резистентністю до ванкоміцину, особливо в штаммах *E. faecium* [266]. Механізми передачі *esp* різняться між видами: у *E. faecalis* він переноситься шляхом хромосомної кон'югації, тоді як у *E. faecium* інтегрується в кон'югативні плазмиди [265].

*Cyl* є одним із найкраще вивчених факторів вірулентності ентерококів. Це цитотоксичний екзотоксин, який виявляє бактерицидну активність проти грамнегативних бактерій та руйнує еритроцити, лейкоцити й макрофаги. Генетичні детермінанти *cyl* знаходяться на феромонозалежних плазмідах або островах патогенності. *Cyl* поширений у багатьох видах ентерококів (*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. cecorum*, *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. malodoratus* та *E. raffinosus*) клінічного, тваринного та харчового походження [75, 129, 135, 236].

*GelE* — позаклітинна цинкозалежна металоендопептидаза, що кодується геном *gelE*, розташованим у хромосомі ентерококів. Вона гідролізує білки позаклітинного матриксу та сприяє формуванню біоплівки [55]. Ген *gelE* бере участь у казеїнолізі під час росту ентерококів у молочних субстратах, що впливає на смак і текстуру сиру та забезпечує накопичення біоактивних пептидів з потенційною користю для здоров'я [135]. *GelE* переважно зустрічається в

клінічних і харчових штамів *E. faecalis*, тоді як у *E. faecium* він виявляється рідко, що відповідає більш високій протеолітичній активності *E. faecalis* [97].

*Hyl*-фактор специфічно розпізнає мукополісахариди сполучної тканини та хрящів, що сприяє поширенню ентерококів у тканинах хазяїна [55]. У клінічних ізолятах він переважно зустрічається в *E. faecium* і рідко — у деяких штамів *E. faecalis* [180]. Крім того, *Hyl* був виявлений у штамів інших видів ентерококів (*E. casseliflavus*, *E. mundtii*, *E. durans*), виділених з харчових продуктів [55].

Більшість досліджень підтверджують, що *E. faecalis* загалом несе ширший спектр детермінант вірулентності, ніж *E. faecium*, у тому числі серед харчових ізолятів [49, 59, 97, 103, 121, 142, 163, 250, 319]. У багатьох дослідженнях гени, що кодують фактори адгезії (наприклад, *asal/agg*, *esp* та *efaA*), були дуже поширені серед сирних ізолятів *E. faecalis* [47, 48, 52, 122, 142, 162, 237, 296], але також могли бути виявлені і в *E. faecium* [122, 237, 274, 275, 287, 319]. Висока мінливість факторів вірулентності на рівні штамів унеможлиблює оцінку безпеки роду *Enterococcus* загалом. Саме тому Європейське агентство з безпеки харчових продуктів не надало ентерококам статусу QPS (Qualified – кваліфіковане Presumption - припущення of Safety - безпечності) [143], а Адміністрація з контролю за харчовими продуктами та лікарськими препаратами (FDA) — статусу GRAS (Generally Recognized As Safe (загальноновизнаний як безпечний) [22, 143], що обмежує їх широке використання у харчовій промисловості та підкреслює необхідність індивідуальної оцінки кожного штаму.

### **1.2.3. Антибіотикорезистентність ентерококів**

Здатність ентерококів протистояти антибіотикам, сформована в ході еволюції роду, є ключовим чинником їхнього успіху як нозокоміальних патогенів. Вроджена резистентність, зумовлена хромосомними генами, виникла під селективним тиском середовища кишківника, де бактерії повинні були витримувати дію природних антимікробних факторів господаря (лізоциму, антимікробних пептидів, жовчних детергентів) та фізіологічних стресів [193].

Набута резистентність, в свою чергу пов'язана, з мобільними генетичними елементами – плазмідами й транспозонами, або з мутаціями, що забезпечує швидку адаптацію до сучасних лікарняних умов.

Трансмисивні елементи родини Tn3, зокрема Tn917 (стійкість до макролідів, лінкозамідів, стрептогранінів В), Tn1546 (глікопептидів) та кон'югативний Tn916 (стійкість до тетрациклінів), відіграють провідну роль у поширенні детермінант резистентності [282]. Плазмід, особливо феромон-залежні (характерні для *E. faecalis*) та плазмід типу Inc18, забезпечують ефективний горизонтальний перенос як усередині роду, так і між різними бактеріями, включно з передаванням ванкоміцин-резистентності до метицилін-резистентних *S. aureus* [279]. Клінічні ізоляти часто містять кілька плазмід та транспозонів, що збільшує їхню генетичну пластичність [152].

Хоча мутації також сприяють формуванню резистентності, ключовим механізмом її поширення залишається горизонтальний перенос генів (HGT) передусім кон'югація [332], яка відбувається, переважно у великих бактеріальних популяціях під селективним тиском [111, 314]. Ентерококи розвинули HGT, що пояснює, принаймні частково, поширення генів антибіотикорезистентності в цьому роді [54]. В цих бактеріях не виявлено природної трансформації, а роль трансдукції залишається обмеженою [169]. Високій частоті HGT сприяє відсутність функціональних систем CRISPR та ефективна феромон-залежна передача плазмід [38, 278]. Завдяки цьому ентерококи активно обмінюються генетичними детермінантами як між собою, так і з іншими представниками кишкової мікробіоти (лактококи, біфідобактерії, стрептококи, стафілококи, лістерії тощо) [1, 182].

Історично *E. faecalis* був основним етіологічним агентом, однак за останні два десятиліття провідну роль у мультирезистентних інфекціях почав відігравати *E. faecium* [26]. Одним із можливих пояснень цієї зміни є поява ванкоміцин-резистентних ентерококів (VRE), більшість із яких у перших клінічних повідомленнях належали до *E. faecium*. Фактори, що сприяли цьому також включають клональне поширення певних штамів, селективний тиск тривалих

курсів антибіотиків та обмежену ефективність стандартних стратегій контролю інфекцій [243]. Геномні дослідження показують, що клінічна клада *E. faecium* сформувалася приблизно 80 років тому, на початку ери антибіотиків, і відзначається надзвичайно високою пластичністю, зумовленою накопиченням мобільних елементів та гіпермутабельністю [193, 227].

Види *Enterococcus* мають внутрішню резистентність до цефалоспоринів, низьких рівнів більшості інших  $\beta$ -лактамінів, низьких концентрацій аміноглікозидів, пеніцилінів, сульфаметоксазолу, триметоприму, сульфонамідів, кліндаміцину, а також хінупристину та далфопристину. Така резистентність вважається типовою для ентерококів. Крім того, *E. casseliflavus* та *E. gallinarum* демонструють внутрішню резистентність до низьких рівнів ванкоміцину [152].

Вроджена резистентність ентерококів до  $\beta$ -лактамінів, включно з цефалоспоринами, обумовлена наявністю білків, що зв'язують пеніцилін (PBP) з низькою афінністю, які слабо взаємодіють із цими антибіотиками. Оскільки ентерококи не синтезують фолати, вони конститутивно резистентні до сульфонамідів. Внутрішня резистентність до лінкозамідів, стрептограміну А та комбінації хінупристину–далфопристину в *E. faecalis*, ймовірно, обумовлена активним виведенням ліків, що кодується хромосомним геном *lsa*. У *E. faecalis* внутрішня резистентність до клінічно досяжних концентрацій аміноглікозидів пояснюється низькою проникністю клітинної стінки для молекул цього класу. Цю форму резистентності можна подолати, поєднуючи аміноглікозид з пеніциліном [98]. Набута резистентність у *Enterococcus* включає стійкість до хлорамфеніколу, еритроміцину, тетрацикліну, фторхінолонів, глікопептидів, а також високих рівнів кліндаміцину, аміноглікозидів та  $\beta$ -лактамінів [124]. Серед цих антибіотиків хлорамфенікол та ванкоміцин входять до Модельного переліку основних лікарських засобів ВОЗ, тому запобігання поширенню резистентності до цих препаратів є надзвичайно важливим [356].

Ентерококи можуть підвищувати резистентність до пеніцилінів шляхом набуття плазмідних генів *bla*, що кодують  $\beta$ -лактамази [152], або через мутації у

PBR4 (*E. faecalis*) та PB5 (*E. faecium*) [124]. Продукція  $\beta$ -лактамаз зустрічається рідко і переважно в *E. faecalis* [152].

Розвиток високого рівня резистентності до аміноглікозидів у *E. faecalis* та *E. faecium* зазвичай зумовлений набуттям мобільних генетичних елементів, що кодують антибіотик-модифікуючі ферменти. Головним детермінантом такої резистентності є біфункціональний ген *aph(2'')-Ia-aac(6')-Ie*, який забезпечує стійкість до всіх клінічно значущих аміноглікозидів, крім стрептоміцину [152]. Резистентність до стрептоміцину зазвичай визначається наявністю гену *ant-6* [124].

З медичної точки зору тривожним є поширення набутої резистентності до глікопептидів, таких як ванкоміцин та тейкопланін (ванкоміцин-резистентні ентерококи, VRE), оскільки ванкоміцин та тейкопланін є терапевтичними засобами останньої лінії. Мішенню ванкоміцину є клітинна стінка, де він перешкоджає формуванню пептидних зшивок, що критично для стабільності бактеріальної структури.

До теперішнього часу описано дев'ять оперонів, що забезпечують резистентність до ванкоміцину у штамів ентерококів. Чотири з них — *vanA*, *vanB*, *vanC* та *vanM* — кодують заміну кінцевого D-аланіну у пентапептидних попередниках на D-лактат, забезпечуючи стійкість як до ванкоміцину, так і до тейкопланіну. Решта оперонів (*vanC*, *vanE*, *vanG*, *vanL* та *vanN*) призводять до утворення попередників з кінцевим D-серіном. Штами з цими детермінантами демонструють низький рівень резистентності до ванкоміцину, але залишаються чутливими до тейкопланіну. [1, 124]. Генотипи ванкоміцин-резистентності *vanA* та *vanB* є найпоширенішими в Європі, при цьому *E. faecium* типу VanA становить найбільшу клінічну проблему для людей. На відміну від *E. faecium*, резистентність до ампіциліну та ванкоміцину у *E. faecalis* зустрічається рідко [182].

Незважаючи на значний обсяг досліджень, присвячених антибіотикорезистентності та її генетичним детермінантам у клінічних ентерококів, глибокий аналіз цих характеристик у ентерококів, ізольованих із

сирів ручної роботи, представлений лише в небагатьох роботах. Тому наявні дані наразі не дозволяють провести повноцінну оцінку ризиків, пов'язаних із присутністю антибіотикорезистентних штамів та мобільних генетичних детермінант резистентності [47, 48, 113, 121, 164, 209, 236].

Водночас виявлення передавальних детермінант резистентності до клінічно важливих антибіотиків, зокрема аміноглікозидів і ванкоміцину, широкий спектр фенотипічної резистентності у штамів *E. faecalis*, а також наявність мультирезистентних ентерококів викликають обґрунтоване занепокоєння. Подальше дослідження цього питання є нагальним не лише для стримування поширення антибіотикорезистентності, але й для формування повнішого уявлення про безпеку штамів, що через свої технологічні властивості та пробіотичні, можуть стати цінним ресурсом для підвищення якості та інноваційності харчових продуктів.

### **1.3. Бактеріоцини: характеристика, потенціал та застосування в медицині та агропродовольчій промисловості**

Бактеріоцини – це широко поширені, структурно та функціонально гетерогенні рибосомно синтезовані антимікробні пептиди бактерій і архей, які можуть зазнавати ферментативних посттрансляційних модифікацій або залишатися немодифікованими [72, 110, 150, 170, 298]. За оцінками, від 30% до 99% прокаріотів продукують один або кілька бактеріоцинів [331]. Переважно вони характеризуються вузьким спектром бактерицидної чи бактеріостатичної активності проти філогенетично споріднених мікроорганізмів, хоча інколи проявляють широкий спектр дії [71, 77 230, 324]. Їхні біосинтетичні кластери зазвичай мають просту організацію та часто локалізовані на мобільних генетичних елементах, зокрема плазмідах і транспозонах [110]. Бактеріоцини спочатку синтезуються у вигляді біологічно неактивних прекурсорів із N-кінцевим лідерним пептидом, який видаляється під час процесингу та транспортуванню. Захист бактеріоциногенних штамів забезпечується системами

аутоімунітету, що включають специфічні білки-інгібітори та/або ефлюксні насоси [27, 31, 39, 232, 298, 303, 330, 331].

До найпоширеніших бактеріоциногенних родів, асоційованих із мікробіотою людини, належать *Enterococcus*, *Escherichia*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Staphylococcus* і *Streptococcus*. Вони не лише конкурують із потенційними патогенами, але й сприяють підтриманню резистентності та імунної рівноваги через продукцію бактеріоцинів [34, 65, 77, 187, 191, 176, 365].

Функціональна активність бактеріоцинів визначається їхньою здатністю розпізнавати специфічні рецептори на поверхні клітин-мішеней та взаємодіяти з гідрофобними компонентами мембран [339]. Таке розпізнавання ґрунтується на іонних та фізико-хімічних контактах та є початковим етапом їхнього антимікробного механізму дії. Для подальшого проникнення через мембрану та її дестабілізацію бактеріоцини має ефективно зв'язуватися з відповідними рецепторами. Наприклад, немодифіковані бактеріоцини класу II (педіоцини PA-1, ентероцини CRL35) переважно взаємодіють із манозофосфотрансферазою, тоді як посттрансляційно модифіковані бактеріоцини класу I (RiPP), такі як нізин і мутацин 1140, з ліпідом II [137, 233, 353, 369].

Взаємодія бактеріоцинів із клітинною поверхнею є чутливою до зовнішніх фізико-хімічних чинників, включно з температурою, рН та складом середовища, які впливають на структуру мембрани та доступність рецепторів [339]. Залежно від їхньої структури, бактеріоцини реалізують антимікробну дію через різні механізми: індукцію лізису шляхом порушення синтезу клітинної стінки або формування пор у мембрані, а також через внутрішньоклітинні ефекти, зокрема інгібування синтезу протеїнів та регуляції експресії генів [77, 89].

Від моменту відкриття бактеріоцинів майже століття тому, кількість охарактеризованих представників цього класу антимікробних пептидів невпинно зростає. Бактеріоцини відзначаються високою структурною та функціональною різноманітністю, охоплюючи широкий спектр розмірів, конфігурацій, механізмів дії та специфічності щодо клітин-мішеней. Для систематизації цієї різноманітності створено низку інтегрованих баз даних та інструментів з відкритим

доступом, таких як antiSMASH 2.0, BAGEL3, ADAM, BACTIBASE, NucleBact, LABiocin та Syngulon [295].

Спираючись на попередню класифікацію [72] та сучасні досягнення у вивченні рибосомно синтезованих і посттрансляційно модифікованих пептидів (RiPP), Солтані та ін. [330] запропонували оновлену систему класифікації, яка поділяє бактеріоцини на два основні класи. Клас I (RiPP) характеризується молекулярною масою <5 кДа і наявністю посттрансляційних модифікацій. До нього належать 12 підкласів, зокрема лантипептиди, сактипептиди, лінійні азол(ин)вмісні пептиди (LAP), кільцеві пептиди, глікоцини, нуклеотидні пептиди, ласопептиди, сидерофорні пептиди та боттроміцини, а також тіопептиди й лінаридини актинобактерій та ціанобактини, що продукуються ціанобактеріями [62, 72, 215, 216, 229, 263, 331]. Клас II охоплює немодифіковані бактеріоцини з молекулярною масою <10 кДа. Він включає три підкласи: педіоциноподібні бактеріоцини (однопептидні молекули з консенсусною послідовністю YGNGV), двопептидні бактеріоцини (два або більше немодифікованих пептидів), непедіоциноподібні бактеріоцини (лінійні однопептидні молекули без мотиву YGNGV). Посттрансляційні модифікації надають бактеріоцинам класу I більшої стійкості до екстремальних значень рН, високих температур і протеолітичного розщеплення порівняно з бактеріоцинами класу II. Водночас наявність дисульфідних містків у деяких представників класу II також сприяє підвищенню їхньої стабільності [229, 330].

Продукція бактеріоцинів давно розглядається як ключова властивість пробіотичних та захисних культур. Більшість бактерій, що продукують бактеріоцини, зокрема молочнокислі бактерії та кишкові коменсали, широко застосовуються як пробіотики або захисні культури в харчовому виробництві, а також як добавки для тварин і людей [70, 72, 89, 2013]. Хоча екологічна роль бактеріоцинів досі повністю не з'ясована, вважається, що вони суттєво впливають на функціональність пробіотиків в організмі. Виконуючи роль колонізуючих пептидів, бактеріоцини сприяють закріпленню та домінуванню штаму-продуцента у сформованій мікробній ніші [11, 298].

Бактеріоцини здатні безпосередньо пригнічувати патогенні або конкурентні мікроорганізми [326] або ж опосередковано модулювати мікробні спільноти та імунну систему господаря через сигнальні механізми [58, 133]. Наприклад, штам *P. acidilactici* MM33, що продукує педіоцин PA-1, ефективно контролював VRE ентерококи, тоді як його непродукуючий аналог не мав ефекту [228]. Нові бактеріоцини – зокрема цереїн B4080, цереїн 7B, бактеріоцин AS-48, гарвіцин KS і мікрококцин P1 – розглядаються як перспективні альтернативи для лікування інфекцій, спричинених полірезистентним *S. aureus* [165, 273, 350].

Біофункціональні властивості бактеріоцинів у поєднанні з їхньою значною структурною різноманітністю зумовлюють високий потенціал цих молекул у біомедицині та агрохарчовій галузі. Бактеріоцини вирізняються широким спектром структурних і функціональних характеристик та часто перевершують життєздатні клітини-продуценти за безпекою, біодоступністю, абсорбцією, розподілом і метаболічною стабільністю, зберігаючи при цьому високу біологічну активність [196, 339].

Сучасні дослідження зосереджуються на вивченні антимікробних властивостей бактеріоцинів для розроблення нових пробіотичних та терапевтичних стратегій [161]. Подібно до пробіотиків, бактеріоцини демонструють патоген-специфічну антимікробну дію. Зокрема, у дослідженні Кора та ін. [70] пероральне введення бактеріоцину АВР118, синтезованого *L. salivarius* UCC118, забезпечувало ефективніший контроль інфекції *Listeria monocytogenes* порівняно з непродукуючим варіантом штаму [148].

Бактеріоцини, отримані від пробіотичних штамів, досліджуються як у очищеному вигляді, так і в комбінації зі штамми-продуцентами [2, 156, 224, 343, 363]. Тому комплексна оцінка їхніх антимікробних профілів за різних експериментальних умов є необхідною для подальшого використання бактеріоцинів у боротьбі проти антибіотикорезистентних патогенів у фармації та харчовій промисловості.

### 1.3. Технологічна роль та пробіотичний потенціал ентерококів, виділених з молочних продуктів

#### 1.3.1. Поширеність представників роду *Enterococcus* в молочних та ферментованих продуктах

Ентерококи можуть бути присутніми у значних кількостях у молочних продуктах, досягаючи концентрації до  $10^8$  КУО/г [132]. Вони належать до однієї з найпоширеніших груп молочнокислих бактерій у сирому молоці [123] та потрапляють до нього переважно з виробничого середовища [90, 128, 132, 174] та обладнання, а не внаслідок фекального забруднення, попри їхню асоціацію з кишковою мікробіотою людини й тварин [173]. Дослідження Джезольміно та ін. продемонструвало, що доїльні машини та резервуари для зберігання молока є ключовими точками внесення ентерококів у виробничий ланцюг [128]. Подальші роботи підтвердили, що саме середовище доїння, а не тварини, є основним джерелом VRE ентерококів [269], тоді як мастит може додатково сприяти появі мультирезистентних штамів.

На різноманітність ентерококів у сирому молоці також впливає сезонність, що показано у дослідженні McAuley та ін. [219, 342]. У сирому молоці корів, кіз та овець найчастіше виявляють *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* та *E. hirae*, рідше — *E. saccharominimum* і *E. italicus* [40, 126, 174, 219, 220, 284, 285, 310, 342]. У коров'ячому та овечому молоці також описано *E. dispar*, *E. malodoratus*, *E. pseudoavium* та *E. gallinarum*. Натомість *E. casseliflavus*, *E. mundtii*, *E. aquamarinus*, *E. asini*, *E. saccharolyticus*, *E. sulfureus* та *E. raffinosus* виявляли лише у коров'ячому молоці, а *E. vikkensis* – виключно в овечому. Менша різноманітність видів, описана для козячого та овечого молока, імовірно, відображає обмежену кількість досліджень цих продуктів.

Сире молоко залишається джерелом ентерококів і для пастеризованих продуктів, оскільки окремі види здатні витримувати температури пастеризації [54]. При цьому рівень термостійкості суттєво варіює залежно від виду та фази росту клітин [212]. Унаслідок цього мікробіота пастеризованого молока відрізняється від сирого: *E. durans* зазвичай домінує після пастеризації, тоді як у

сирому молоці найчастіше виявляють *E. faecalis* [219]. Окрім термостійкості, присутність ентерококів у пастеризованих продуктах може бути зумовлена повторним забрудненням після теплової обробки, зокрема через контакт із молочним обладнанням. Біоплівки на його поверхнях слугують важливим резервуаром бактерій, що має особливе значення для виробництва сиру. [86, 132, 164].

У традиційних сирах ідентифіковано близько 19 видів ентерококів, зокрема *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. devriesei*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. gilvus*, *E. hiraе*, *E. italicus*, *E. lactis*, *E. malodoratus*, *E. mundtii*, *E. pallens*, *E. pseudoavium*, *E. ratti*, *E. saccharominimus*, *E. sulfureus* та *E. villorum*, що становить приблизно третину від усіх відомих видів роду [81, 85, 92, 134, 138, 269, 286, 338, 348, 372]. Найпоширенішими у більшості сирів є *E. faecalis* та *E. faecium*, рідше – *E. durans* [132]. Водночас реальна різноманітність може бути значно вищою, оскільки у багатьох дослідженнях використовувалися культуральні або низьковартісні молекулярні методи ідентифікації, що могло призвести до недооцінки видового складу сирних екосистем.

У багатьох традиційних сирах ентерококи входять до складу нестартових сирних молочнокислих бактерій (NSLAB), а в окремих випадках застосовуються як компоненти експериментальних стартових культур [50, 132, 260, 361]. Як представники NSLAB, вони беруть участь у формуванні характеристичних сенсорних властивостей низки ремісничих сирів, зокрема Армада, Капріно, Качокавалло Палермітано, Себрейро, Комте, Фета, Фонтіна, Маджореро, Манчего, Моцарелла, Монте Веронезе, Піко, Серра, Венако, а також Ras і Domiatі (Єгипет) та Izmir Tulum (Туреччина) [91, 132, 139, 210, 260, 361].

### **1.3.2. Метаболіти ентерококів та їх вплив на сенсорні властивості молочних продуктів**

Через порівняно слабку здатність до підкислення та обмежену протеолітичну активність, ентерококи зазвичай не розглядають як ключові компоненти первинних заквасок у сироварінні. Водночас вони можуть бути

перспективними для використання або як допоміжні [113, 125, 132, 146, 293], або як захисні культури [10, 132]. Допоміжні культури навмисно вводять у сир для підсилення інтенсивності та формування збалансованого смакового профілю. Їх зазвичай добирають серед NSLAB, тому під час скринінгу особливу увагу приділяють метаболічним властивостям штамів, що визначають аромат і текстуру продукту, зокрема здатності до ліполізу, протеолізу, деградації амінокислот, естеразної активності та метаболізму цитрату [140].

Окремі штами ентерококів, виділені із сирого молока, демонструють важливі технологічні властивості, що впливають на органолептичні характеристики продуктів, включно з виробленням діацетилу, автолітичною, протеолітичною [114, 284] та ліполітичною активністю [341], а також пробіотичним потенціалом [21]. Ентерококи є ауксотрофами щодо кількох амінокислот [347], тому їхній ріст у молочних середовищах залежить від амінопептидаз, які вивільняють незамінні амінокислоти з казеїну, утворених унаслідок первинного протеолізу [178]. Гідроліз казеїну здійснюється позаклітинним протеолітичним комплексом Clp, після чого олігопептиди транспортуються до клітини та додатково розщеплюються амінопептидазами, слугуючи джерелом азоту та попередниками смакоутворювальних метаболітів.

Вільні амінокислоти можуть декарбоксилюватися до біогенних амінів; відповідні декарбоксилазні системи ентерококів активуються в кислому середовищі та сприяють підтриманню рН-гомеостазу за умов обмеження поживних речовин [268]. Ентерококи часто є основними продуцентами біогенних амінів у сирі, зокрема гістаміну, тираміну, 2-фенілетиламіну, кадаверину та путресцину [25]. Водночас амінопептидазна активність вважається бажаною властивістю для сирних культур, оскільки вона сприяє вивільненню смакоутворювальних сполук – малих пептидів і вільних амінокислот – та може запобігати появі небажаних присмаків [222]. Зокрема, амінопептидаза P зменшує гіркоту шляхом гідролізу проліновмісних олігопептидів, що утворюються після протеолізу казеїну [217]. Активність

амінопептидаз ентерококів у ремісничих сирах значною мірою є штам-специфічною [46, 210, 260, 341].

Цитратний метаболізм ентерококів також впливає на формування смаку сиру, приводячи до утворення летких C4-сполук, таких як діацетил, ацетоїн і бутандіол. CO<sub>2</sub>, що утворюється внаслідок метаболізму цитрату, бере участь у формуванні «очок» у сирах типу Гауда та Данбо. [214]. Вироблення діацетилену та, меншою мірою, ацетоїну було зафіксовано в ентерококів, ізольованих із сирів; [53, 91, 260, 309, 341] чий геномні дані також підтверджують наявність у них генів, що кодують ферменти для синтезу ацетальдегіду, діацетилену та ацетоїну [214, 268].

Крім того, припускають, що здатність ентерококів продукувати екзополісахариди (EPS) може бути цінною технологічною характеристикою, особливо для сирів із низьким вмістом жиру, де EPS сприяють покращенню текстури та водоутримувальної здатності продукту [207].

Проте, незважаючи на підтверджений внесок ентерококів у формування смаку ферментованих сирів, їхній потенціал як стартових культур залишається дискусійним і потребує подальшого обґрунтування.

### **1.3.3. Вплив біоактивних сполук *Enterococcus* на здоров'я людини**

Окрім впливу на сенсорні характеристики ремісничих сирів, протеолітична активність ентерококів щодо білкової фракції молока та сиру на різних етапах визрівання може сприяти утворенню біоактивних пептидів, що потенційно корисні для споживачів. Такі пептиди, що складаються з 2–20 амінокислотних залишків, можуть проявляти антигіпертензивні, гіпохолестеринемічні, антигіперглікемічні, імуномодулювальні, антимікробні та антиоксидантні властивості [124, 184]. Вироблення антигіпертензивних пептидів ентерококами під час ферментації молока продемонстровано *in vitro* [135, 141, 294], та на тваринних моделях [238, 291]. Торрес-Лланес та ін. [340] показали, що свіжий сир із *E. faecium* характеризується високою АПФ-інгібуючою активністю *in vitro*, тоді як інше дослідження засвідчило зниження артеріального тиску у дорослих

споживачів традиційного норвезького сиру Gamalost [261]. В огляді Баптісти та ін. [24] повідомлено про наявність АПФ-інгібуючих пептидів у сирах Вальдеон, Грана Падано, Маасдам, Горгонзола, Чеддер і Парміджано-Реджано; більшість таких пептидів (3-7 амінокислотних залишків) походять із  $\beta$ -казеїну. Показано, що процес визрівання сиру інтенсифікує вивільнення біоактивних пептидів, а додаткове травлення *in vitro* підтверджує можливість їх ефективної доставки у складі харчової матриці сиру [205, 213].

Альбано та ін. [4] продемонстрували, що штам *E. lactis* здатний знижувати концентрацію холестерину як у поживному середовищі, так і у складі допоміжної культури для сиру. Крім того, пероральне введення окремих штамів *E. faecalis* або *E. faecium* спричиняло значне зниження рівня холестерину в сироватці крові у тваринних моделях гіперхолестеринемії [17, 102, 154]. Для *E. faecium* було показано підвищену екскрецію холестерину та диференційовану експресію генів, пов'язаних із його деградацією, транспортом і синтезом [17]. Транслокації перорально введених бактерій, яка могла б свідчити про інвазивний потенціал, не спостерігали, тоді як рівень ліпопротеїнів низької щільності знижувався на моделі лабораторних мишей [4].

Ферментовані *E. faecalis* молочні продукти продемонстрували інгібування  $\beta$ -глюкозидази *in vitro*, що вказує на потенціал у контролі гіперглікемії [135]. Дані експериментів на мишах також вказують, що пробіотичні штами *E. faecium* можуть чинити *in vivo* антигіперглікемічну дію та знижувати інсулінорезистентність при введенні разом із їжею [4]. Штам *E. faecalis*, ізольований із традиційної туніської рігути, підвищував секрецію інтерлейкіну-10 у клітинах Сасо-2/ТС7 на 28%, що підтверджує його імуномодулювальний потенціал [22]. У огляді Грема та ін. [135] зазначено, що молоко, ферментоване штамми *E. faecalis* із сирів, характеризувалося високим вмістом фенольних сполук і вираженою радикал-поглинальною активністю.

Наразі встановлено, що кишковий мікробіом відіграє ключову роль у функціонуванні осі «кишечник-мозок» і впливає на психічне здоров'я людини через низку механізмів, зокрема шляхом синтезу нейромедіаторів [83]. Штами

*Enterococcus* spp. здатні продукувати серотонін у кишечнику, що сприяє взаємодії між кишечником і центральною нервовою системою [194]. Крім того, ентерококи можуть синтезувати  $\gamma$ -аміномасляну кислоту (ГАМК) – нейромедіатор, який бере участь у регуляції нейрональної збудливості та асоціюється з потенційним зниженням тривожності, покращенням якості сну й психоемоційної рівноваги [114, 308].

Ентерококи також належать до небагатьох харчово-асоційованих бактерій, здатних синтезувати кон'юговану лінолеву кислоту (CLA) – групу ізомерів омега-6 поліненасиченої жирної кислоти, що привертає значну увагу завдяки потенційному біологічному впливу на організм людини. У літературі повідомляється, що CLA може впливати на регуляцію ліпідного обміну, склад тіла та енергетичний метаболізм, проявляти антиоксидантні й імуномодулювальні властивості, а також мати потенційні протипухлинні та кардіопротекторні ефекти [254]. Кішіно та ін. [181] продемонстрували, що окремі штами ентерококів можуть продукувати високі концентрації CLA в лабораторних умовах, тоді як Росс та колеги [301] запропонували застосовувати LAB-продуценти CLA для створення нових сирів із доданою функціональною цінністю.

Деякі види ентерококів, виявлені в сирому молоці, зокрема *E. faecalis*, *E. faecium* та *E. mundtii*, здатні продукувати бактеріоцини. Завдяки цьому ентерококи можуть модулювати мікробіоту молока та мікробні спільноти молочних продуктів, сприяючи мікробіологічній безпеці продукції та покращенню її сенсорних властивостей [285].

#### **1.3.4. Ентероцини як фактори модуляції мікробіоти ентерококами**

Багато штамів ентерококів, асоційованих із сиром, синтезують широкий спектр бактеріоцинів (ентероцинів), які проявляють антимікробну активність проти численних грампозитивних харчових патогенів і мікроорганізмів псування, зокрема *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, ендоспор кластридій, вегетативних клітин, а також проти інших молочнокислих бактерій [16, 63, 117, 132, 297, 324, 349, 362]. Різноманітність ентероцинів

пов'язують зі здатністю ентерококів до горизонтального перенесення генетичного матеріалу. Зокрема, гени ентероцинів EJ97 та AS-48 локалізовані на кон'югативних феромон-чутливих плазмідах, що забезпечує їх швидке та ефективне поширення між бактеріальними клітинами [117].

У сирі бактеріоцин-продукуючі ентерококи можуть модулювати мікробіоту під час процесу дозрівання [64], сприяти автолізу та підвищенню проникності клітин заквасок і NSLAB із супутнім вивільненням внутрішньоклітинних ферментів, що впливає на формування органолептичних властивостей продукту [19, 203, 272]. У низці досліджень описано експериментальне використання бактеріоциногенних штамів *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium* та *E. mundtii* як захисних культур у виробництві сиру [16, 63, 244, 297, 349]. Виробництво ентероцинів частково пояснює успішну колонізацію сирної матриці ентерококами та досягнення ними високої чисельності [117].

Крім того, потенціал окремих штамів ентерококів до модуляції мікробіоти шлунково-кишкового тракту при пероральному введенні було продемонстровано в експериментальних моделях на тваринах [17, 371]. Отже, здатність до синтезу ентероцинів є важливою функціональною характеристикою допоміжних культур із захисними властивостями

### **1.3.5. Ентерококи як потенційні пробіотики**

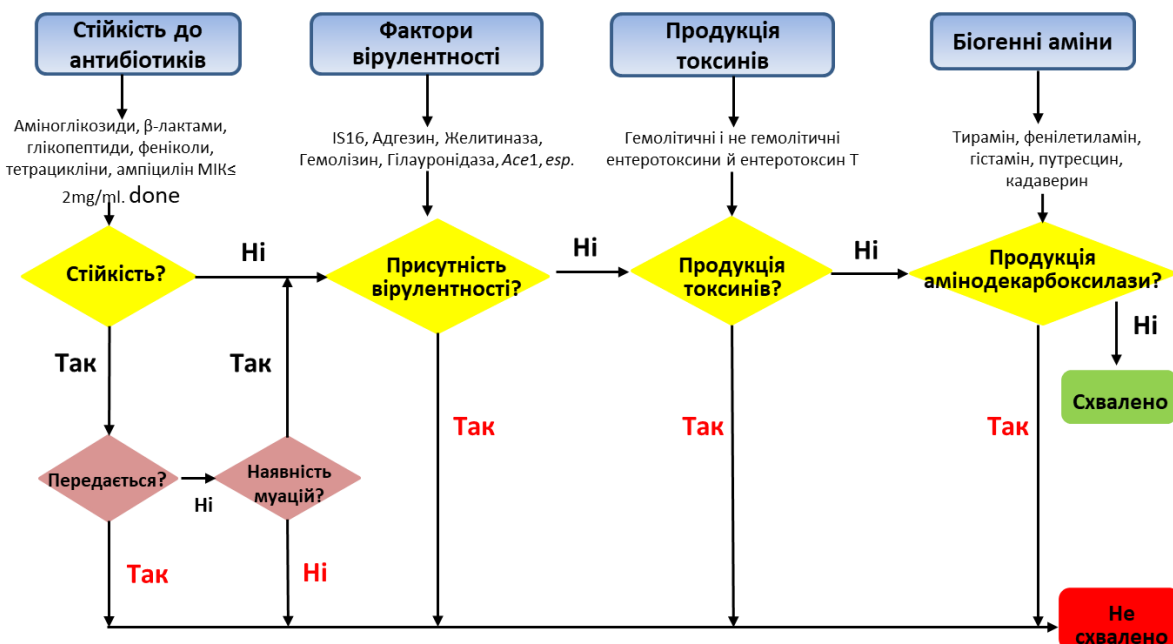
Численні потенційні переваги для здоров'я, пов'язані з ентерококами, у поєднанні з їхньою здатністю виживати під час проходження через проксимальні відділи шлунково-кишкового тракту та колонізувати кишечник господаря, роблять цей рід перспективним кандидатом для розробки пробіотичних культур. Важливим чинником їхньої пробіотичної активності є здатність до синтезу ентероцинів, які можуть надавати штамам-продуцентам конкурентну перевагу у шлунково-кишковому тракті завдяки вираженій антимікробній дії. Таким чином, ентерококові штами, що продукують ці антимікробні пептиди, здатні ефективніше закріплюватися в кишечнику господаря, безпосередньо

пригнічувати патогенні мікроорганізми та модулювати склад і функціональну активність кишкової мікробіоти [271].

Незважаючи на це, ентерококові пробіотики досі мали обмежений комерційний успіх і переважно доступні у формі харчових добавок [353], тоді як традиційні ремісничі сири можуть слугувати джерелом потенційних пробіотичних штамів [22, 51, 153, 234, 252, 305, 362]. Основні обмеження комерційного використання ентерококів у пробіотичних препаратах і харчових продуктах для споживання людиною пов'язані з проблемами безпеки, недостатністю інформації щодо властивостей, які визначають безпеку та потенційні переваги для здоров'я, а також із несприятливим регуляторним середовищем [143].

Хоча ентерококи історично були складовою мікробіоти сирів із доведеною безпекою споживання, за останні 80 років ситуація істотно змінилася. Відкриття та широке застосування антибіотиків створили новий селективний тиск, який, імовірно, впливає на еволюцію ентерококів і може мати значення для здоров'я людини [76]. Зокрема, занепокоєння викликають фактори адгезії, здатність ентерококів виступати резервуарами генів вірулентності та антибіотикорезистентності, схильність до горизонтального переносу генів (як у межах роду, так і між різними бактеріями), а також відсутність достатніх доказів користі для здоров'я і статусу QPS/GRAS.

Наявних даних про безпеку та переваги ентерококів як пробіотиків недостатньо для проведення повноцінного аналізу ризиків. Якщо штами ентерококів, виділені з сиру чи інших джерел, планується використовувати як пробіотики, цю прогалину в знаннях необхідно подолати. Тому ретельне вивчення фенотипових характеристик, пов'язаних із безпекою, та генетичних детермінант є обов'язковим для кожного штаму перед його застосуванням у харчових продуктах (рис.1.1.).



**Рис 1.1.** Рекомендована схема оцінки безпеки пробіотичних штамів *Enterococcus* для використання їх в харчових продуктах/кормах. Адаптовано за матеріалами EFSA Panel on Biological Hazards [147], EFSA [100] та Laulund et al. [190].

З огляду на ці потенційні ризики, у деяких випадках доцільніше використовувати очищені або напівочищені ентероцини як антимікробні харчові добавки, ніж продукувати їх безпосередньо в продукті (*in situ*) [74, 292].

## РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

### 2.1. Матеріали досліджень

#### 2.1.1. Штами мікроорганізмів

Штам *Enterococcus* sp. SB12 виділяли з бринзи, традиційного карпатського сиру, шляхом прямого посіву гомогенату зразків сиру на стерильний фізіологічний розчин на середовище Де Ман-Рогоза-Шарпа (MRS) (BTL, Польща) та інкубували при 45°C протягом 48-72 годин [328]. Бактеріальні клітини зберігали в ліофілізованому вигляді при 4°C в ампулах.

#### 2.1.2. Середовища та умови культивування

Склад усіх середовищ, використаних у роботі, наведено в Додатку Б. Для виділення хромосомної ДНК штам культивували в рідкому середовищі MRS (HiMedia, Індія).

Для дослідження мікробіологічних особливостей та антибіотикорезистентності, SB12 вирощували на агаризованому MRS середовищі.

Для вивчення антагоністичних властивостей використовували агаризоване TSB середовище (HiMedia, Індія).

Штами тест-культур бактерій вирощували на середовищі LB, штамми тест-культур грибів вирощували на середовищі Сабуро (Conclab, Іспанія).

Для виявлення продукції біогенних амінів штам SB12 та контроль – *E.coli* АТТС, вирощували на середовищі DAB.

Для отримання екстрактів вторинних метаболітів SB12 культивували в рідких середовищах TSB, VHI (HiMedia, Індія) та MRS.

Штам *Enterococcus* sp. SB12 та тест-культури бактерій вирощували при 37°C, тест-культури грибів вирощували при температурі 28-30°C.

### 2.1.3. Реактиви

Компоненти поживних середовищ, які використовували в роботі перелічені в додатку Б.

У роботі використовували диски з антибіотиками: стрептамідин, еритроміцин, ванкомідин, ампіцилін, пеніцилін, канаміцин, рифампіцин, гентаміцин, левіміцитин (хлорамфенікол), тетрациклін (HiMedia Laboratories, Індія) у стандартних концентраціях.

Речовини амінокислот були використані для ідентифікації продукції біогенних амінів: L-гістидин (Carl Roth, Німеччина), L-орнітин (Carl Roth, Німеччина), L-тирозин (Carl Roth, Німеччина).

Для виділення та аналізу ДНК використовували набір NucleoSpin Microbial DNA Kit (Macherey-Nagel, Німеччина).

Для екстракції та очистки вторинних метаболітів використовували: метанол (Fisher Scientific, США), етилацетат (Fisher Scientific, США), бутанол (Fisher Scientific, США), хлороформ (Fisher Scientific, США).

Для аналізу на MALDI-TOF використовували ціано-4-гідроксикоричну кислоту (CHCA) (MilliporeSigma / Supelco®, США) в суміші ацетонітрил : вода : трифтороцтова кислота та 2,5-дигідроксибензойну кислоту (DHB) (MilliporeSigma / Supelco®, США) у тій самій суміші.

Для визначення біохімічних показників мишей використовували: комерційні набори для аналізу рівнів холестеролу, загального білка та глюкози (Filisit, Україна): CHOLESTEROL-HDL F (53391), CHOLESTEROL-LDL F (HP026.05), GLUCOSE F (53301) та Total Protein (61900); трихлороцтову кислоту (Fisher Scientific, США), тіобарбітурову кислоту (СфераСім, Україна), перекис водню (ТОВ «ДКП «Фармацевтична фабрика», Україна), молібдат амонію (Fisher Scientific, США), динітрофенілгідразин (Sigma-Aldrich, США), хлоридну кислоту (Сфера Сім, Україна), сечовину (СфераСім, Україна), етанол (Fisher Scientific, США), сіль Мора (СфераСім, Україна), тіоціанат амонію (Kleberh, Німеччина).

### 2.2.1. Експериментальні тварини

Усі експериментальні процедури з тваринами *in vivo* були схвалені Комітетом з біоетики Інституту біології тварин Національної академії наук України (Протокол №162 від 02.12.2024) відповідно до чинного законодавства України та Європейського Союзу.

Для експерименту *in vivo* було взято двомісячних безпородних білих самок мишей з віварію Львівського національного університету імені Івана Франка. Перед початком експерименту вони пройшли тижневу акліматизацію у віварії Інституту біології тварин Національної академії аграрних наук України. Протягом усього експериментального періоду миші мали необмежений доступ до води та стандартного гранульованого корму, утримувалися в приміщенні з контрольованим кліматом із заданою температурою, вологістю та циклом світло/темрява (температура: 22-24 °С, вологість: 50-65% та 12-годинний цикл світло/темрява). Мишей було випадково розділено на 4 групи: М1 й М2 – контрольна група та М3 й М4 – дослідна група. Всього було залучено 20 мишей. Контрольна група мишей (n = 10) отримувала стандартний лабораторний раціон. Тваринам другої (експериментальної) групи (n=10), які перебували на стандартному лабораторному раціоні, додатково перорально вводили суспензію пробіотичного штаму *Enterococcus* sp. SB12 у дозі  $1 \times 10^8$  КУО/г маси тіла. Моніторинг середньодобового споживання води лабораторними мишами здійснювали для кількісної оцінки добового надходження бактеріальних клітин на одну мишу.

На 29-й день експерименту мишей вивели з експерименту шляхом швидкого зміщення шийних хребців. Для генетичних та біохімічних досліджень були зібрані зразки крові, тканин та органів експериментальних та контрольних тварин. Зразки печінки, серця, нирок та кишечника гомогенізували в 1М Tris-HCl, рН=7,4 та зберігали при температурі -20°C до аналізу.

## 2.3. Методи досліджень

### 2.3.1. Виділення сумарної ДНК з *Enterococcus sp.* SB12 та повногеномне секвенування.

Геномну ДНК виділяли за допомогою набору NucleoSpin Microbial DNA Kit (Macherey-Nagel, Німеччина) відповідно до протоколу виробника. Для виділення тотальної ДНК *Enterococcus sp.* SB12 висівали в 20 мл середовища MRS та інкубували при 37 °C протягом 12 годин. Для вимірювання концентрації та якості виділеної геномної ДНК використовували спектрофотометр DS-11 (DeNovix Inc., США) при співвідношенні A260/280. Отриману ДНК секвенували у ТОВ «Експлоген» (Львів, Україна) з використанням бібліотеки парних секвенів Illumina (TruSeq Sample Preparation Kit, Illumina, США), як рекомендовано виробником. Повногеномне секвенування проводили з використанням гібридного підходу, який поєднує секвенування з коротким зчитуванням Illumina та секвенування з довгим зчитуванням Oxford Nanopore. Геномні дробові бібліотеки Illumina були підготовлені з використанням протоколу без ПЛР, згідно з інструкціями виробника (Illumina, Inc.). Секвенування проводили на системі Illumina Novaseq 6000 в режимі зчитування 2 × 250 bps. Збірку даних Illumina проводили за допомогою програми Newbler v3.0 [226]. Для секвенування довгих зчитувань використовували технологію Oxford Nanopore (Оксфорд, Великобританія).

Геномні бібліотеки готували з високомолекулярної ДНК з використанням наборів SQK-LSK110 (Оксфорд, Великобританія). Для зшивання зчитувань для підготовки бібліотеки лігування нанопорами використовували набір NucleoSpin Genomic DNA Prep Kit (Macherey-Nagel, Німеччина). Бібліотеку секвенували на одній проточній комірці Flongle (R10.4.1) з 24-годинним циклом. Виклик основ здійснювали за допомогою програми Guppy v5.0.11 з моделлю dna\_r9.4.1\_450bps\_sup [357]. Збірка даних Oxford Nanopore Technologies (ONT) була виконана за допомогою Flye v.2.9 b1774 [183]. Якість зчитування як для Nanopore, так і для Illumina перевіряли за допомогою інструменту контролю

якості FASTQC версії 0.11.9 [43], а видалення адаптерів проводили за допомогою AdapterRemoval v2 [315], використовуючи налаштування за замовчуванням.

Послідовності повного геному *Enterococcus* sp. SB12 були депоновані під номерами доступу CP175675-CP175677 (PRJNA1006558 для BioProject і SAMN37043343 для BioSample) в базу даних GenBank.

### **2.3.2. Біоінформатичні інструменти для аналізу геному**

Сервер Proksee [136] було використано для створення геномної карти та ідентифікації мобільних генетичних елементів у геномі. Для прогнозування функцій білків у геномі використовували базу даних Clusters of Orthologous Groups of proteins (COGs) [334]. Послідовності профагів були передбачені та анотовані за допомогою програми PHASTEST [358]. Кластеризовані регулярно розташовані ділянки коротких паліндромних повторів (CRISPR) прогнозували за допомогою CRISPRCasFinder [73]. Кластери біосинтезу бактеріоцину та вторинних метаболітів ідентифікували за допомогою BAGEL4 [346] та antiSMASH версії 7.0 [37]. Кластери генів первинного метаболізму виявляли за допомогою програми gutSMASH [370]. Для прогнозування тривимірної структури бактеріоцинів використовували програму Phyre 2.2 [288].

Для визначення наявності факторів вірулентності в геномі використовували Virulence Factor Database v6.0 [200], гени антибіотикорезистентності прогнозували за допомогою Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) з використанням суворих і досконалих критеріїв [218], а для визначення патогенних генів використовували Pathogen-Host Interactions Database (PHI-base) v4.14 [344]. Одночасний і швидкий доступ до всіх біоінформатичних додатків забезпечувався платформою ProBioMin Server, яка також використовувалася для узагальнення даних, отриманих з геному *Enterococcus* sp. SB12 [202].

Пошук подібних геномів та геномну філогенію проводили в Ресурсному центрі бактеріальної та вірусної біоінформатики (BV-BRC) з використанням сервісу Bacterial Genome Tree Service. Для геномного філогенезу було

використано 1000 однокопійних ортологічних генів. Недупліковані гени, знайдені в усіх проаналізованих геномах, використовували для побудови філогенетичного дерева методом кодонового дерева [267]. Для порівняльного геномного аналізу використовували дані геномів типового штаму *E. faecium* DSM 20477, штамів, близьких до штаму SB12, *E. faecium* INF12, *E. faecium* YM46-4 та *E. faecium* CICC 20430, пробіотичного штаму *E. faecium* T110 та клінічного ізоляту *E. faecium* ATCC 700221. Геноми всіх штамів, включених в аналіз, доступні в Національному центрі біотехнологічної інформації.

### 2.3.3. Конструювання, секвенування та аналіз метагеномних даних

Зразки кишківників контрольної та експериментальної груп мишей були зібрані на 29-й день після евтаназії. Для екстракції ДНК використовували набори DNeasy PowerSoil Pro Kits (Qiagen, Німеччина). Ділянку V3-V4 16S рРНК ампліфікували за допомогою праймерів 341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') та 806R (5'-GGACTACNVGGGTWTСТААТ-3'). Ділянку внутрішнього транскрибованого спейсера 2 (ITS2) ампліфікували за допомогою праймерів ITS3-2024F (5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3) та ITS4-2409R (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3). ПЛР-продукти очищали за допомогою набору для екстракції гелем QIAquick (Qiagen, Німеччина) та секвенували на платформі Illumina Novo-Seq6000 з бібліотекою парних кінців 2 × 250 та глибиною секвенування понад 100 000 зчитувань (Novogene (UK) Company Limited, Велика Британія). Парні кінці зчитувань об'єднували за допомогою FLASH (версія 1.2.11) [208]. Аналіз послідовностей проводили за допомогою UPARSE (версія 7.0.1001) [99]. Усі послідовності з  $\geq 97\%$  подібності відносили до тих самих операційних таксономічних одиниць (OTU). Репрезентативну послідовність для кожної OTU перевіряли для подальшої анотації. Подальшу анотацію OTU було виконано за допомогою програмного забезпечення Mothur у базі даних SSU rRNA SILVA для анотації видів бактерій [290] та базі даних Unite [151] на основі алгоритму blast для анотації видів грибів. Множинне вирівнювання послідовностей було виконано за допомогою алгоритму MUSCLE (версія 3.8.31).

Необроблені послідовності були депоновані в Архіві зчитування послідовностей (SRA) Національного центру біотехнологічної інформації (NCBI) під номером доступу SRR37451812-SRR37451819, номером доступу біопроекту PRJNA1431476 та номерами біозразків SAMN56311790-SAMN56311797.

#### **2.3.4. Визначення антимікробної активності**

Для визначення антимікробної активності *Enterococcus* sp. SB12 використовували типові культури опортуністичних патогенів (Колекція культур мікроорганізмів-продуцентів антибіотиків, Україна). *Enterococcus* sp. SB12 висівався смужкою в центрі чашки з агаризованим середовищем MRS, і залишали чашку в термостаті на 24 години при температурі 37 °C. Потім по 10 мкл тестових культур у третьому розведенні висівалося смужками на чашку, перпендикулярними до штаму SB12, і інкубували при 37 °C впродовж 24-ох годин. Після цього виміряли зону пригнічення росту патогенів по відношенню до SB12. Експеримент проводили тричі.

#### **2.3.5. Визначення антибіотикорезистентності**

Для визначення стійкості *Enterococcus* sp. SB12 до антибіотиків обрали найчастіше використовувані антибіотики у фармакології, а також приналежні до всіх наявних груп антибіотиків. Для експерименту ентерокок висівали газonom на чашку з агаризованим MRS та інкубували 24 години при 37 °C. Опісля на чашку виставляли диски з антибіотиками та залишали чашки ще раз на добу при 37 °C. Стійкість визначали за відсутністю зони росту SB12 навколо антибіотика.

#### **2.3.6. Визначення термостійкості**

Термотолерантність *Enterococcus* sp. SB12 визначали за Páez et al. [277], з деякими модифікаціями. Інокулят *Enterococcus* sp. SB12 розводили в 1 мл фізіологічного розчину в концентрації 1% (v/v) та інкубували на водяній бані протягом 15 хв при 37 °C (як контроль), 50 °C, 60 °C, 70 °C та 80 °C відповідно. Потім готували десятикратні серійні розведення зразків (через  $10^{-7}$ ) і пересівали

їх на агаризоване MRS. Чашки інкубували впродовж 24-ох годин при 37 °С, після чого підраховували колонієутворюючі одиниці (КУО) для визначення виживання *Enterococcus* sp. SB12. Для отримання статистично достовірних результатів експерименти повторювали тричі.

### **2.3.7. Визначення солестійкості**

Для визначення солестійкості штаму SB12 готували десятикратні серійні розведення (через  $10^{-7}$ ) клітинної суспензії *Enterococcus* sp. SB12 (приблизно  $1 \times 10^8$  КУО). Після цього 100 мкл кожного розведення висівали на агар MRS, до якого додавали NaCl у концентраціях 2,5%, 5,0%, 7,5% та 10%. Ріст *Enterococcus* sp. SB12 оцінювали через 24 години інкубації при 37 °С шляхом підрахунку КУО та визначення відсотка виживання. Для отримання статистично достовірних результатів досліди повторювали тричі.

### **2.3.8. Визначення стійкості до лізоциму**

Для визначення резистентності до лізоциму клітини *Enterococcus* sp. SB12 розводили в 1 мл фізіологічного розчину і додавали 100 мкл (приблизно  $1 \times 10^8$  КУО) до 0,1 мг/мл, 0,5 мг/мл, 1,0 мг/мл, 5,0 мг/мл, 10 мг/мл і 20 мг/мл розчину лізоциму в фізіологічному розчині. Як контроль використовували суспензію *Enterococcus* sp. SB12, розчинену у фізіологічному розчині. Контрольну та лізоцимну групи бактерій інкубували впродовж 10 хвилин при 37°C. Після цього клітини бактерій відмивали у фізіологічному розчині, розводили в 10 разів (через  $10^{-7}$ ) і висівали на агаризоване середовище MRS. Кількість КУО підраховували і визначали виживання бактерій після інкубації впродовж 24-ох годин при 37 °С. Для отримання статистично достовірних результатів експеримент повторювали тричі.

### **2.3.9. Визначення стійкості до різних значень рН середовища**

Для оцінки кислотостійкості штаму використовували метод, описаний Feng et al. [109], з незначними модифікаціями. *Enterococcus* sp. SB12 висівали у стерильний фізіологічний розчин з рН 1,0, 2,0, 3,0 і 4,0 та інкубували впродовж 3 годин при 37 °С. Як контроль використовували стерильний фізіологічний розчин з рН 7,0. Рівень рН регулювали за допомогою 0,1 М розчину НСІ. Потім клітини всіх експериментальних груп двічі відмивали фізіологічним розчином. Відмиті клітини ресуспендували в 1 мл фізіологічного розчину, робили десятикратні серійні розведення (через  $10^{-7}$ ) і кожне розведення висівали на агаризоване MRS. Кількість КУО підраховували і визначали виживання бактерій після інкубації впродовж 24-ох годин при 37°С. Експеримент проводили тричі.

### **2.3.10. Виявлення здатності до продукування біогенних амінів**

Здатність *Enterococcus* sp. SB12 продукувати біогенні аміни (БА), такі як гістамін, тирамін та путресцин, оцінювали *in vitro* за допомогою скринінгового методу Bover-Cid та Holzapfel [41] без попередньої активації. Для цього 15 мкл свіжої (24-ох годинної) культури штаму SB12 в MRS висівали на чашку з середовищем DAB з 0,5% L-гістидину (Roth), 0,5% L-орнітину (Roth) або 0,5% L-тирозину (Roth), доведеного до рН 5,5 перед автоклавуванням. Як контроль використовували чашки з середовищем DAB без відповідних амінокислот. Усі чашки інкубували за 37 °С впродовж 48-ми годин.

### **2.3.11. Визначення оптимального рівня рН для культивування**

Для експерименту штаму SB12 інокулювали в рідке середовище MRS з рН= 6,0, 7,0 та 9,0 та вирощували протягом 24-ох годин при 37 °С. Кількість колонієутворюючих одиниць (КУО) штаму SB12 визначали в 10-кратних розведеннях на агаровому середовищі MRS. Процедуру проводили через 2, 4, 8, 16 та 24 години після інокуляції. Зразки, висіяні одразу після дня культивування перед експериментом, брали як контроль. Після інкубації протягом 24-ох годин

при 37°C підраховували кількість КУО. Одночасно вимірювали значення рН у кожній з колб через однаковий інтервал часу. Експеримент проводили тричі.

### **2.3.12. Визначення рівня холестерину ЛПВЩ, холестерину ЛПНЩ, глюкози, вмісту білка**

Рівні холестерину ліпопротеїдів високої щільності (ЛПВЩ), холестерину ліпопротеїдів низької щільності (ЛПНЩ), глюкози та загального білка визначали за допомогою комерційних наборів для аналізу (Filisit, Україна): CHOLESTEROL-HDL F (53391), CHOLESTEROL-LDL F (HP026.05), GLUCOSE F (53301) та Total Protein (61900) відповідно до інструкцій виробника.

### **2.3.13. Визначення рівня гідропероксидів ліпідів**

Визначення вмісту гідропероксидів ліпідів проводило з тіоціанатом амонію згідно методики [351]. До дослідних і контрольних зразків додавали 560 мкл етанолу і 50 мкл 50% розчину трихлороцтової кислоти; до дослідних пробірок також додавали 40 мкл гомогенізованих зразків, а до контрольних пробірок – 40 мкл води. Потім пробірки струшували протягом 5-6 хвилин і центрифугували впродовж 10 хвилин при 3000 об/хв. Далі з контрольних і дослідних зразків відбирали 500 мкл супернатанту, до якого додавали 40 мкл етанолу, 3 мкл концентрованої HCl і 50 мкл 1% солі Мора; зразки струшували і додавали 67 мкл 20% розчину тіоціанату амонію. Екстинкцію вимірювали спектрофотометрично при 480 нм. Розрахунок проводили за формулою:

$$[C] = (E_{\text{проба}} - E_{\text{контроль}}) * C_{\text{білок}}$$

### **2.3.14. Визначення окислювальної модифікації білків**

Ступінь окисної модифікації білків (ОМБ) у сироватці крові та гомогенатах тканин оцінювали за методом, що базується на взаємодії карбонільних груп (альдегідних і кетонних) окиснених амінокислотних залишків із 2,4-динітрофенілгідразином (2,4-ДФГ). У результаті реакції утворюються 2,4-динітрофенілгідразони, інтенсивність забарвлення яких прямо пропорційна

рівню пошкодження білкових молекул [351]. До проб і контрольних зразків додавали 0,1 мл гомогенату зразка і 900 мкл 20% трихлороцтової кислоти. Окремо до проби додавали 1 мл 0,1 М розчину 2,4-динітрофенілгідразину, а до контрольного зразка – 1 мл 2 М розчину HCl. Пробірки інкубували впродовж 1 години при температурі 37 градусів і центрифугували протягом 45 хвилин при 3000 об/хв. Осад тричі промивали сумішшю етанолу та етилацетату у співвідношенні 1 : 1, після до всіх пробірок додавали 2,5 мл 8 М сечовини. Зразки кип'ятили впродовж 5-ти хвилин на водяній бані до повного розчинення осаду. Екстинкцію вимірювали спектрофотометрично при 274, 370 та 430 нм протягом 10 хвилин. Розрахунок проводили за формулою та виражали в одиницях ОМБ на 1 мг білка (або г тканини):

$$[C] = \frac{E_{\text{проба}} \cdot V_{\text{заг.}}}{22 \cdot C_{\text{білок}} \cdot V_{\text{проба}}}$$

### 2.3.15. Визначення вмісту ТБК-активних продуктів

Інтенсивність процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) у сироватці крові та гомогенаті тканин оцінювали за вмістом ТБК-активних продуктів. Змішували 0,01 мл гомогенізованої проби (тест) і 2 мл розчину води (контроль) та інкубували впродовж години при температурі 37 градусів. Потім додавали 1 мл трихлороцтової кислоти і 1 мл 0,8% тіобарбітурової кислоти. Зразки кип'ятили на водяній бані протягом 10 хвилин центрифугували при 3000 об/хв ще 10 хвилин для отримання надосадової рідини. Екстинкцію зразків вимірювали спектрофотометрично при 535 нм відносно контролю. Вміст продуктів ТБК визначали за формулою:

$$[C] = \frac{E_{\text{проба}} \cdot V_{\text{заг.}} \cdot 1000000}{1,56 \cdot V_{\text{проба}} \cdot 100000}$$

### 2.3.16. Визначення активності каталази

До зразків проб і контролів додавали по 100 мкл гомогенату і по 2 мл 0,03% розчину перекису водню. Через 10 хвилин додавали 1 мл 4% розчину молібдату амонію, а через 5 хвилин – розчин 30% трихлороцтової кислоти. Після цього зразок центрифугували протягом 10 хвилин при 3000 об/хв і вимірювали екстинкцію спектрофотометрично при 410 нм. Розрахунок проводили за формулою:

$$[A] = \frac{(\Delta E_{\text{контроль}} - \Delta E_{\text{дослід}}) * 22.2}{t}$$

### **2.3.17. Екстракція та аналіз вторинних метаболітів**

Для екстрагування вторинних метаболітів SB12 культивували у трьох різних середовищах – в TSB, BHI, MRS. Ентерокок інокулювали в 1 мл стерильної води і потім в кількості 100 мкл переносили в колби з 50 мл відповідного середовища. Культуру ентерокока вирощували протягом 24 та 48-ми годин при 37 °С в термостаті для порівняння рівня продукції метаболітів. Вторинні метаболіти екстрагували окремо з культуральної рідини із рівним об'ємом етилацетату, бутанолу та хлороформу, та метанолом – з біомаси. Отримані екстракти випарювали на роторному випарювачі ІКА RV-8 (ІКА, Німеччина) при 40 °С і перерозчиняли в метанолі. Екстракти аналізували на системі Dionex Ultimate 3000 UPLC (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, США) з'єднаній з детектором PDA, використовуючи 100 мм колонку ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 мкм (Waters Corporation, Milford, MA, США). Воду з 0,1% (об./об.) мурашиної кислоти (розчинник А) і ацетонітрил з 0,1% (об./об.) мурашиної кислоти (розчинник Б) використовували як рухоми фазу. Розділення екстрактів здійснювали в лінійному градієнті від 5 до 95% розчинника Б при швидкості потоку 0,6 мл/хв протягом 18 хв за температури 40 °С. Мас-аналіз проводили на мас-спектрометрі Bruker Amazon Speed (Bruker, Billerica, MA, USA) з використанням позитивного режиму іонізації та діапазону виявлення m/z 150–2000 Да. Дані аналізували за допомогою Compass Data Analysis v. 6.1 (Bruker, Billerica, MA, США).

### **2.3.18. Мас-спектрометричний аналіз методом MALDI-TOF**

Мас-спектрометричний аналіз проводили методом матрично-асистованої лазерної десорбції/іонізації з часово-прольотною детекцією (MALDI-TOF MS) у двох масових діапазонах: 4-10 кДа (ля низькомолекулярних білків/пептидів) та 20–40 кДа (для білків вищої молекулярної маси). Для іонізації аналітів використовували: розчин 10 мг/мл  $\alpha$ -ціано-4-гідроксикоричної кислоти (CHCA) в суміші ацетонітрил : вода : трифтороцтова кислота (ACN:H<sub>2</sub>O:TFA) у співвідношенні 50:49.9:0.1; та розчин 20 мг/мл 2,5-дигідроксибензойної кислоти (DHB) у тій самій ACN:H<sub>2</sub>O:TFA суміші, які є стандартними матрицями для аналізу пептидів і білків відповідно. Матриці фільтрували через 0.22 мкм мембранний фільтр перед використанням [29, 175]. Підготовку зразків здійснювали методом dried-droplet. На MALDI-планшет (цільовий металевий диск) наносили суміш аналіту та матриці у співвідношенні 1:1, після чого зразок висушували при кімнатній температурі до утворення однорідного кристалічного шару.

Спектри отримували в лінійному режимі детекції позитивних іонів з використанням MALDI-TOF-MS мас-спектрометра UltrafleXtreme (Bruker Daltonics, Бремен, Німеччина) в Інституті фармацевтичних досліджень імені Гельмгольца Саарландт (Helmholtz Institute for Pharmaceutical Research Saarland, HIPS, Саарбрюккен, Німеччина). Кожний спектр будувався шляхом накопичення >1500 лазерних імпульсів (laser shots) для покращення співвідношення сигнал/шум.

Зовнішню калібровку проводили з використанням стандартних білкових і пептидних калібрувальних сумішей відповідно до рекомендацій виробника приладу.

### **2.3.19. Визначення продукції вітамінів та амінокислот штамом *Enterococcus* sp. SB12**

Для отримання достатньої кількості біомаси штам *Enterococcus* sp. SB12 культивували на середовищі MRS протягом 18 годин при температурі 37 °C.

Біомасу збирали шляхом центрифугування при 4000 об/хв протягом 10 хвилин, промивали стерильною дистильованою водою та ресуспендували. Кількість життєздатних клітин визначали методом послідовного десятикратного розведення та висівання на агар MRS з подальшим підрахунком колоній. Вихід біомаси визначали гравіметричним аналізом сухої маси клітин.

Для аналізу метаболітів бактеріальну біомасу, кондиціоноване середовище та нативне середовище MRS (контроль) піддавали екстракції з подальшою високоефективною рідинною хроматографією (ВЕРХ). Водорозчинні вітаміни, включаючи тіамін гідрохлорид, рибофлавін-5-фосфат, нікотинамід, нікотинова кислота, піридоксин, аскорбінова кислота та пантотенат кальцію, були ідентифіковані та кількісно визначені за допомогою системи ВЕРХ, оснащеної колонкою з оберненою фазою C18 (250 × 4,6 мм, Luna® Omega, розмір частинок 5 мкм) та УФ-детекцією в діапазоні 200–265 нм. Розділення проводили за допомогою системи градієнтної елюції з ацетонітрилом та фосфатним буфером (рН 3,0). Кількісне визначення проводили з використанням сертифікованих стандартів вітамінів HPLC-класу. Зразки готували шляхом екстракції приблизно 1 г бактеріальної біомаси в буферному розчині, після чого перед аналізом проводили центрифугування та мембранну фільтрацію.

Амінокислотний склад визначали методом ВЕРХ після кислотного гідролізу бактеріальної біомаси (15% HCl, 140 °C, 7 год). Гідролізати нейтралізували та дериватизували за допомогою 2,4-динітрофторбензолу, а потім розділяли на колонці з оберненою фазою (250 × 3,0 мм). Детекцію проводили при 350 нм. Ідентифікацію та кількісне визначення здійснювали шляхом порівняння з сертифікованими стандартами амінокислот.

Усі аналізи проводили у трьох повторах, а результати обчислювали на основі стандартних калібрувальних кривих.

### **2.3.20. Дереплікація вторинних метаболітів**

Для дереплікації вторинних метаболітів в екстрактах ізолятів використовували базу даних словника природних сполук (англ. Dictionary of

Natural Products (DNP)) версії 10.0 [44] за такими параметрами: точна молекулярна маса, спектри поглинання, аналіз фрагментації та біологічне джерело [302]. Сполуки вважали подібними, якщо різниця в точних масах була менша, ніж 5 ppm, а спектри поглинання, фрагментація та джерело виділення були ідентичними.

### **2.3.21. Визначення активності екстрактів вторинних метаболітів**

Метаболітні екстракти штаму *Enterococcus* sp. SB12 тестували з використанням тест-культур диско-дифузійним методом. На паперовий стерильний диск ( $d = 4 \text{ mm}$ ) наносили 25 мкл кожного екстракту, висушували і викладали на чашки з тест-культурами. Як негативний контроль використали паперовий диск з метанолом. Після 24 годин інкубування при  $37^\circ\text{C}$  вимірювали зони пригнічення росту.

### **2.3.22. Статистичний аналіз**

Статистичну обробку експериментальних даних проводили з використанням програми Microsoft Excel. Усі дослідження виконували щонайменше у трьох незалежних повторностях. Отримані результати представлені у вигляді середнього арифметичного значення та стандартної похибки середнього ( $M \pm \text{SEM}$ ).

Відповідність розподілу кількісних показників нормальному закону перевіряли за критерієм Шапіро-Вілка. Для порівняння середніх значень між незалежними групами застосовували двосторонній t-критерій Стьюдента.

Відмінності між досліджуваними показниками вважали вірогідними при  $p < 0,05$ . На рисунках статистичні відмінності позначали символами: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$ .

## РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

### 3.1. Характеристика геному штаму *Enterococcus* sp. SB12

#### 3.1.1. Загальна та функціональна характеристика геному *Enterococcus* sp. SB12.

Дослідження генетичної структури штаму є першочерговим етапом у вивченні будь-якого мікроорганізму, оскільки дозволяє отримати інформацію про структурну та функціональну організацію геному та потенційні метаболічні можливості. За допомогою комплексного біоінформатичного аналізу стає можливим ідентифікація генів, пов'язаних з основними метаболічними процесами, адаптацією до умов середовища проживання та іншими особливостями мікроорганізму. Ця інформація визначає можливість та напрямок подальшої роботи з будь-яким штамом бактерій.

За результатами біоінформатичного аналізу, було встановлено, що геном *Enterococcus* sp. SB12 репрезентований однією кільцевою хромосомою та двома кільцевими плазмідами із загальним розміром 2,69 Мб (рис. 3.1.).

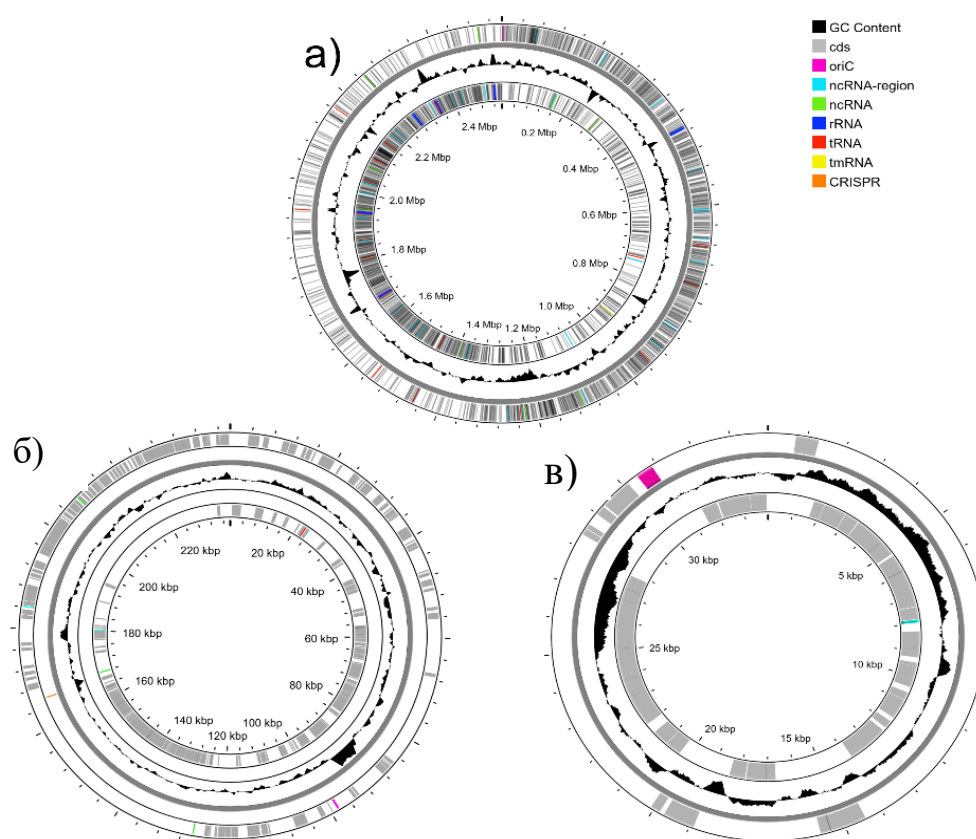


Рис. 3.1. Геном *Enterococcus* sp. SB12. (а) Хромосома (б) Плазміда 1. (в) Плазміда 2. <https://proksee.ca/>

Хромосома має вміст ГЦ 38,2% і містить 2 544 356 п.н. з 3 038 потенційними білково-кодуючими відкритими рамками зчитування (ORF), 69 тРНК, 1 тмРНК, 18 генів рРНК (розташовані в 6 оперонах) і 3 інші некодуючі РНК (табл.3.1.). Плазмідна 1 має розмір 238 123 п.н. з вмістом ГЦ 36,6%, тоді як плазмідна 2 має розмір 33 961 п.н. і вміст ГЦ 34,0%. Вони кодують загалом 258 та 40 ORFs відповідно. Плазмідна 1 містить один ген тРНК (тРНК-Leu).

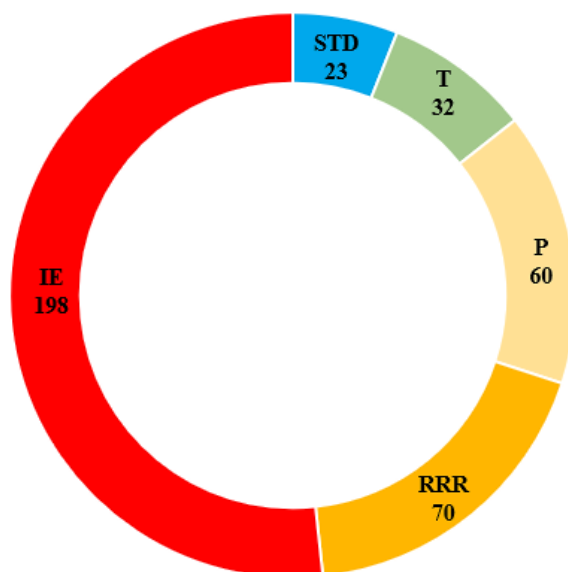
Таблиця 3.1.

Особливості геному штаму *Enterococcus* sp. SB12

Характеристики	Хромосома	Плазмідна 1	Плазмідна 2
Розмір (bp)	2 544 356	238 123	33 961
Г + Ц %	38.2	36.6	34.0
CDS (кодуючі послідовності)	2414	251	40
Відкриті рамки зчитування (ORF)	3038	258	40
Оперони	6	0	0
рРНК	18	0	0
тРНК	69	1	0
тмРНК	1	0	0
нкРНК	3	0	0
Мобільні генетичні елементи	289	84	10
CRISPR	0	1	0
Профагові гени	100	40	0
Гени стійкості до антибіотиків	4	0	0
Фактори вірулентності	18	0	0
Гени патогенності	14	0	0
Кластери генів вторинного метаболізму	2	3	1

Вміст мобільних генетичних елементів є важливою характеристикою будови та функціональності геному, тому що вони значно впливають на еволюцію, адаптацію, і генетичну пластичність мікроорганізмів [169]. Виявлено, що геном SB12 містить 383 мобільні генетичні елементи, серед яких гени інтеграції та ексцизиї (198 генів), гени, що відповідають за рекомбінацію,

реплікацію та репарацію геномів (70 генів), трансферні гени (32) та гени, залучені до процесу захисту стабільності генів (23 гени) (рис. 3.2.).



**Рис. 3.2.** Мобільні генетичні елементи в геномі *Enterococcus* sp. SB12. IE - інтеграція/екзцизія, RRR - реплікація/рекомбінація/репарація, P - фаг, STD - стабільність/перенесення/захист, T - трансфер. <https://proksee.ca/>

У хромосомі штаму SB12 також було виявлено три фагові ділянки (2 інтактні ділянки та 1 сумнівна ділянка) (рис. 3.3.). У першій інтактній фаговій ділянці хромосоми (1 161 222-1 198 213 п.н.) знаходяться гени, що кодують капсид (9 генів), хвіст (5 генів), пластинку (1 ген), терміназу (2 гени), інтегразу (1 ген), репресори (2 гени), ендонуклеазу (1 ген), фагоподібний білок (9 генів) та білок холін (1 ген). У другій інтактній фаговій області (2 102 088-2 153 237 п.н.) виявлено 1 ген капсиду, 6 генів хвоста, 2 гени репресорного білка, 11 генів фагоподібного білка, 2 гени термінази, 3 гени транспозази і по одному гену антирепресора, лізису, регуляторного білка, порталного білка, ендонуклеази, холіну, реплікації та інтегрази; інші гени мають невідомі функції. З сумнівних ділянок (950 п.н., 121-981 п.н. і 952 п.н.) було ідентифіковано по 1 гену термінази, інтегрази, хвостового і регуляторного білка, 2 гени фагоподібних білків і 3 гени капсидів.

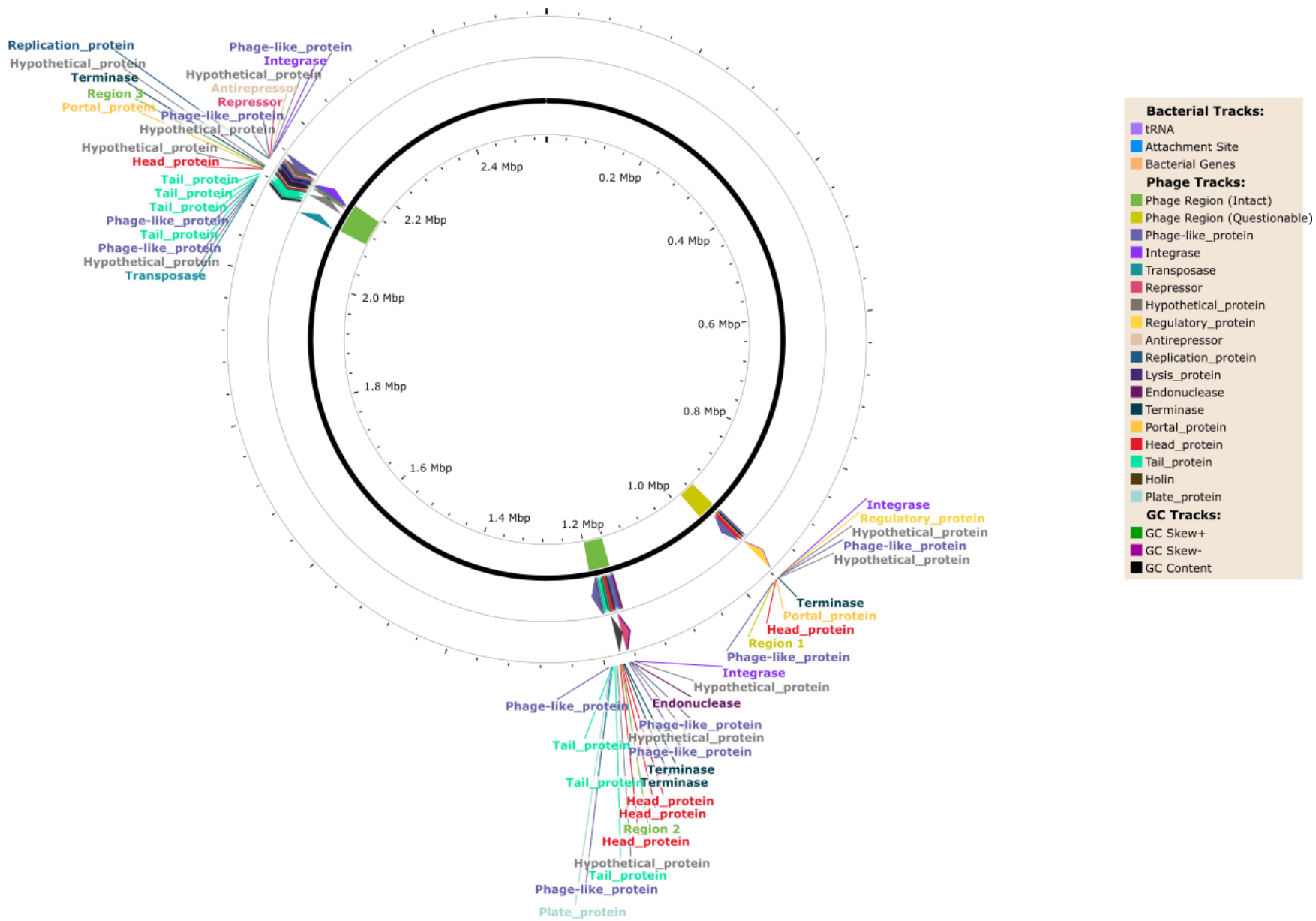


Рис. 3.3. Профагові ділянки, ідентифіковані в хромосомі *Enterococcus* sp. SB12. <https://phastest.ca/>

У плазміді 1 було виявлено три профагові ділянки (2 інтактні ділянки та 1 сумнівна ділянка) та ділянку CRISPR (165 825-165 953 п.н.) (рис. 3.4.). Наявність CRISPR-сайту визначає стійкість до інфікування чужорідною ДНК і, згідно з останніми дослідженнями, може також вказувати на чутливість ентерокока до антибіотиків [5]. У першій інтактній фаговій ділянці плазміді 1 (31 983-66 704 п.н.) було ідентифіковано інтегразу (3 гени), транспозазу (9 генів), протеазу (1 ген), регуляторний білок (1 ген) і фагоподібний білок (1 ген). У другій інтактній фаговій ділянці (170 967-203 022 п.н.) були присутні 6 генів інтегрази, 2 гени транспозази та 1 ген фагоподібного білка. У сумнівній ділянці плазміді 1 (72,832-106,992 п.н.) було виявлено 2 гени інтегрази, 3 гени транспозази та 7 генів фагоподібних білків. Функції інших генів з цих ділянок невідомі.

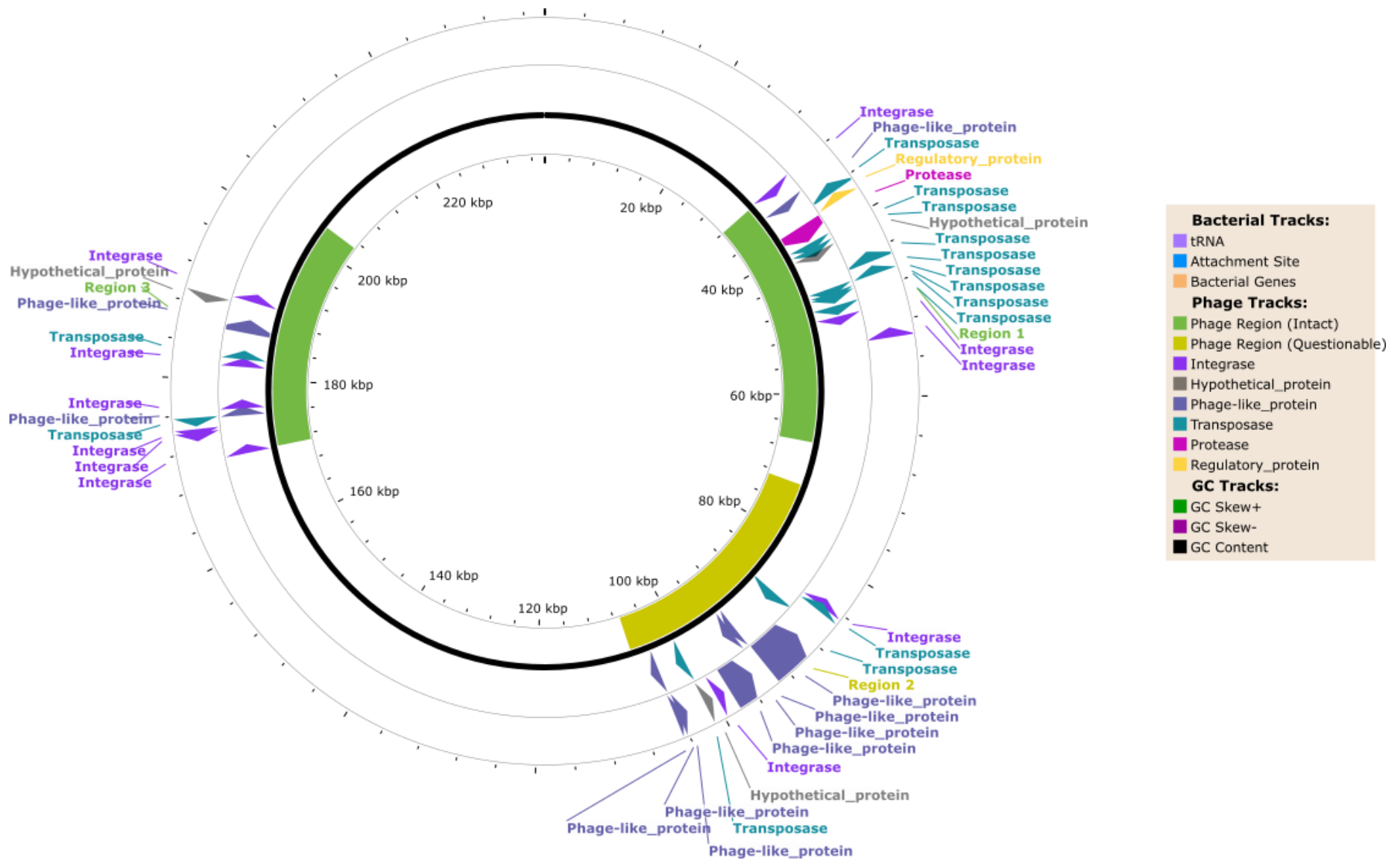
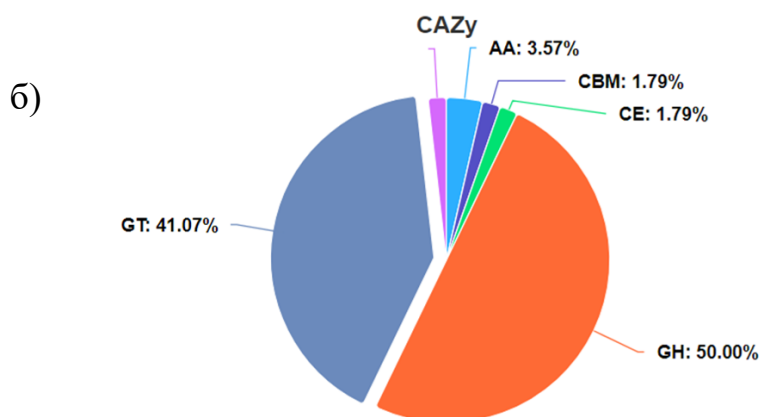
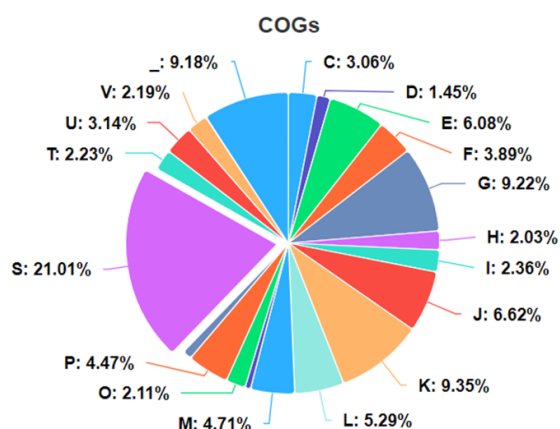


Рис. 3.4. Профагові ділянки, ідентифіковані в плазміді 1 *Enterococcus* sp. SB12. <https://phastest.ca/>

Також було здійснено функціональну анотацію геному SB12, використовуючи базу даних кластерів ортологічних груп білків (COGs). Загалом 2,677 генів, що кодують білки, були віднесені до COG з передбачуваною функцією. Функціональні гени, пов'язані з реплікацією, репарацією та рекомбінацією (313 ORFs), транскрипційними білками (242 ORFs), транспортом та метаболізмом вуглеводів (235 ORFs) та трансляцією, рибосомною структурою та біогенезом (164 ORFs), були віднесені до найбільш поширених функціональних категорій COG (рис. 3.5.).

- а)
- A: процесинг і модифікація РНК
  - B: структура й динаміка хроматину
  - C: виробництво та перетворення енергії
  - D: контроль клітинного циклу, поділ клітин та поділ хромосом
  - E: транспорт та метаболізм амінокислот
  - F: транспорт та метаболізм нуклеотидів
  - G: обмін та транспорт вуглеводів
  - H: транспорт та метаболізм коензимів
  - I: транспорт та метаболізм ліпідів
  - J: трансляція, структура рибосом та біогенез
  - K: транскрипція
  - L: реплікація, рекомбінація і репарація
  - M: біогенез клітинної стінки/мембрани
  - N: рухливість клітин
  - O: посттрансляційна модифікація
  - P: транспорт та метаболізм неорганічних іонів
  - Q: синтез, транспорт та катаболізм вторинних метаболітів
  - **S: НЕВІДОМА ФУНКЦІЯ**
  - T: механізми сигнальної трансдукції
  - U: внутрішньоклітинний транспорт та секреція
  - V: механізми захисту
  - -: неідентифіковано



- AA – допоміжні активності
- CBM – карбогідратзв'язуючий модуль
- CE – карбогідрат естераза
- GH – глікозид гідролаза
- **GT - глікозилтрансфераза**

**Рис. 3.5.** Результати функціональної анотації геному *Enterococcus* sp. SB12: (а) Загальні функціональні категорії генів, (б) Ферменти, які беруть участь у синтезі,

метаболізмі та розпізнаванні складних вуглеводів (дисахаридів, олігосахаридів, полісахаридів і глікокон'югатів). <https://probiomindb.imst.nsysu.edu.tw/>

### **Підсумки до підрозділу 3.1.1.**

1. Згідно біоінформатичного аналізу встановлено, що геном *Enterococcus* sp. SB12 складається з однієї кільцевої плазміді та двох кільцевих плазмід із загальним розміром 2.69 Мб.
2. Виявлено інтактні ділянки профага на хромосомі та плазміді 1 із транспозазами та фаговими генами, що свідчить про мобільність геному *Enterococcus* sp. SB12 і про високу ймовірність горизонтального переносу генетичного матеріалу. На плазміді 2 не ідентифіковано фагових елементів.
3. Функціональна анотація геному *Enterococcus* sp. SB12 показала, що більшість білків у метаболізмі штаму залучені в процесах підтримки стабільності та відтворюваності ДНК, а також в транспорті та метаболізмі вуглеводів.

Результати досліджень наведені вище опубліковано у статтях [248, 249] та матеріалах конференції [376].

### 3.1.2 Скринінг генів антибіотикорезистентності, патогенних генів та факторів вірулентності

Відомо, що основним обмеженням для використання ентерококів в якості пробіотиків є ризик, пов'язаний із наявністю у деяких штамів генів патогенності та антибіотикорезистентності, а також можливістю передачі цих генів іншим бактеріям [159]. Тому було проведено аналіз геному *Enterococcus* sp. SB12 на наявність таких генів.

Біоінформатичний аналіз геному *Enterococcus* sp. SB12 виявив декілька генів, відповідальних за стійкість до різних класів антибіотиків. Зокрема, ідентифіковано ген *vanY* з кластеру *vanB* (вказує на стійкість до глікопептидних антибіотиків). Крім того, було виявлено ген аміноглікозидної 6'-N-ацетилтрансферази (стійкість до аміноглікозидних антибіотиків), що є невід'ємною характеристикою усіх ентерококів, і не є індикатором його потенційної шкідливості [328]. Також були ідентифіковані такі гени стійкості як, ген *efrA* (стійкість до макролідних антибіотиків) і ген *eatAv* (стійкість до антибіотиків плевромутилінового ряду) (табл. 3.2.). Всі ці гени розташовані на хромосомі штаму.

Таблиця 3.2.

Гени резистентності виявлені в геномі *Enterococcus* sp. SB12 за допомогою The Comprehensive Antibiotic Resistance Database

Ген	Продукт	Клас антибіотиків	Механізм стійкості	Ідентичність, %
<i>AAC(6')-Ii</i>	аміноглікозид N-ацетилтрансферази <i>AAC(6')-Ii</i>	аміноглікозиди	Інактивація антибіотика	99.45
<i>vanY</i>	D-аланіл-D-аланін карбоксипептидаза	глікопептиди	Зміна мішені дії антибіотика;	34.9
<i>efrA</i>	ABC транспортер	макроліди; фторхінолон	ефлюкс	82.81
<i>eatAv</i>	ABC транспортер EatAv	плевромутилін	Захист мішені дії антибіотика	98.8

<https://card.mcmaster.ca/>

Використання бази даних PHI-base дозволило ідентифікувати в геномі *Enterococcus* sp. SB12 14 асоційованих з патогенністю генів (табл. 3.3.), кожен з яких відіграє певну роль у різних біологічних процесах.

Таблиця 3.3.

Гени, асоційовані з патогенністю, виявлені у *Enterococcus* sp. SB12 за допомогою Pathogen-Host Interactions Database

Ген	Ідентичність, %	Функція	Ген ID
<i>CspA</i>	99.40	глобальний транскрипційний регулятор репресії вуглецевих катаболітів	AFK59626
<i>tufA</i>	86.26	фактор елонгації Tu	АНМ69299
<i>ldh-1</i>	86.11	Окислювально-відновний баланс	ААО80120
<i>IMPDH</i>	82.35	інозин-5'-монофосфатдегідрогеназа	ADE32434
<i>rnjB</i>	82.11	РНКаза J2	ААО80984
<i>WalR</i>	95.73	транскрипційний регуляторний білок	ЕРН95667
<i>ClpP</i>	81.05	Частина протеолітичного комплексу	ВAB94595
<i>CspR</i>	93.85	Білок холодого шоку	ААО82613
<i>CspA</i>	86.36	Білок холодого шоку	СAA62903
<i>HMPREF0351_1011</i> 8 (WxL locusC)	89.80	Задіяний у жовчно-сольовому стресі та патогенезі ендокардиту	HMPREF0351_1011 8
<i>rnc</i> (EF3097)	80.37	РНКаза III	ААО82778
<i>csnA</i> (EF0846)	83.95	DEAD-box геліказа	ААО80658
<i>csnB</i> (EF1377)	82.33	DEAD-box геліказа	ААО81168
<i>rny</i> (EF3170)	88.22	РНКаза Y	ААО82844

<http://www.phi-base.org/>

Фактори вірулентності в геномі *Enterococcus* sp. SB12 були анотовані базою даних факторів вірулентності (VFDB) (табл. 3.4.). Загалом в геномі SB12 було анотовано 16 генів, асоційованих з вірулентністю, які беруть участь в процесах адгезії, утворення біоплівки та модуляції імунної відповіді. Усі ідентифіковані фактори були локалізовані на хромосомі.

Таблиця 3.4.

Фактори вірулентності, виявлені у *Enterococcus* sp. SB12 за допомогою Virulence Factor Database

Ген	Продукт	VF назва/категорія	Ідентичність (%)	VF ген ID	Ідентифікаційний номер
<i>cpsA/uppS</i>	ундекапренилдифосфатсинтаза	Капсула / Імунна модуляція	100.00	VFG0456 88	WP_002294134
<i>ACI49670</i>	потенційна піліасоційована сортаза	пілі PGS1 типу PilA / Адгезія	99.87	VFG0429 87	ACI49670
<i>ACI49673</i>	асоційований з клітинною стінкою LPXTG-подібний білок	пілі PGS1 типу PilA / Адгезія	99.87	VFG0429 86	ACI49673
<i>efaA</i>	специфічний ендокардитний антиген	Вее підсилювач утворення біоплівки в ентерококах / Адгезія	99.79	VFG0456 14	WP_002286843
<i>ACI49668</i>	мінорна субодиниця піліну	Вее підсилювач утворення біоплівки в ентерококах / Адгезія	99.71	VFG0429 84	ACI49668
<i>cpsB/cdsA</i>	Фосфатидатцидилтрансфераза	Вее підсилювач утворення біоплівки в ентерококах / Адгезія	99.62	VFG0456 82	WP_002296531
<i>pilA</i>	PilA	Вее підсилювач утворення біоплівки в ентерококах / Адгезія	99.29	VFG0429 88	ACI49671
<i>ACI49672</i>	Потенційна сортаза генів домашнього господарства	ВорD/ біоплівка	99.26	VFG0429 89	ACI49672
<i>srt1</i>	Srt1	Рецептор стрептококового плазмину / Адгезія	99.17	VFG0429 97	AAZ68040
<i>bee2</i>	Bee2	Адгезія	98.91	VFG0429 95	AAZ68038

<i>bee3</i>	Bee3	пілі PGS1 типу PilA / Адгезія	98.86	VFG0429 96	AAZ68039
<i>srt2</i>	Srt2	Фібронектин- зв'язуючий білок /	98.75	VFG0429 98	AAZ68041
<i>bopD</i>	цукрозв'язуючий транскрипційний регулятор, родина LacI	Адгезія	94.80	VFG0456 70	WP_002286379
<i>plr/gapA</i>	гліцеральдегід-3- фосфатдегідроген аза I типу	пілі PGS1 типу PilA / Адгезія	80.72	VFG0190 77	WP_000260685
<i>ACI49669</i>	гіпотетичний гідрофобний пептид	Вее підсилювач утворення біоплівки в ентерококах / Адгезія	98.85	VFG0429 85	ACI49669
<i>EFMU0317</i> <i>_RS16950</i>	Пептидаза сімейства C40	Вее підсилювач утворення біоплівки в ентерококах / Адгезія	98.80	VFG0434 41	WP_002287386

<https://www.mgc.ac.cn/VFs/>

Водночас серед ідентифікованих генів не було виявлено таких важливих факторів вірулентності, як *IS16*, *esp* (ентерококовий поверхневий білок), *gylE* (желатиназа), *asal* (фактор агрегації), *Cyl* (цитолізін) і *hyl* (гемолізін/гіалорунідаза), які зазвичай беруть участь у прикріпленні, колонізації та пошкодженні клітин і тканин хазяїна. Згідно з даними Європейського агентства з безпеки харчових продуктів (EFSA), наявність генів *IS16*, *esp*, *gylE*, *asal*, *cyl* і *hyl* в геномі ентерокока вважається небажаною, і штами, що містять такі гени, не можуть розглядатися як безпечні [15]. У геномі *Enterococcus* sp. SB12 ці гени не були виявлені, незважаючи на наявність гена *act* (фактор колаген-зв'язуючої адгезії), який часто зустрічається разом з генами *esp* і *hyl* [25].

### Підсумки до підрозділу 3.1.2.

1. Ідентифіковано гени стійкості до аміноглікозидних, глікопептидних, макролідних та плевромутилінових антибіотиків: *AAC(6')-Ii*, *vanY*, *efrA*, *eatAv*.
2. Виявлено 14 генів, асоційованих з патогенністю та 16 генів асоційованих з вірулентністю.

3. Незважаючи на відсутність у геномі ключових факторів вірулентності, наявність генів, пов'язаних з патогенністю потребує подальших досліджень для оцінки безпечності *Enterococcus* sp. SB12.

Результати досліджень наведені вище опубліковано у статті [249] та матеріалах конференції [376].

### 3.1.3. Дослідження біосинтетичного потенціалу штаму *Enterococcus* sp.

#### SB12

Ентерококи характеризуються синтезом бактеріоцинів, які розглядаються як можлива альтернатива антибіотикам для вирішення проблеми антибіотикорезистентності, а також визначають їх здатність бути пробіотиками [6, 135]. Тому одним із ключових завдань цієї роботи було виявити кластери генів первинного та вторинного метаболізму в геномі *Enterococcus* sp. SB12 за допомогою біоінформаційних інструментів BAGEL4, antiSMASH та gutSMASH, а також експериментально довести його антимікробний потенціал.

Відомо, що кишкові бактерії відповідають за синтез і трансформацію різних молекул, що беруть участь у взаємодії між хазяїном і мікробами. У процесі еволюції багато з них почали спеціалізуватися на певних метаболічних трансформаціях, формуючи спеціалізовані генні кластери (MGS). За допомогою програми gutSMASH у геномі штаму SB12 було виявлено кластер генів, що кодують білки, пов'язані з метаболізмом галоїної кислоти (100,0% ідентичність з октапреніл-4-гідроксибензоаткарбоксілазою *E.coli*, 3,4-дигідроксибензоатдекарбоксілазою *K. michiganensis*). Крім того, ідентифіковано кластери генів та ферментів: шлях аргініндеїмінази (66,0% ідентичність з орнітинкарбамоїлтрансферазою *P.aeruginosa*), піруватфередоксиноксидоредуктази (100,0% ідентичність з MGS *B.thetaiotaomicron*) та піруватформіатліази (100,0% ідентичність з MGS *E. coli*). (рис.3.6.)

Identified primary metabolite regions							
Region	Type	Class	From	To	Most similar known cluster		Similarity
Region 1.1	gallic_acid_met	Aromatic	375,289	397,395	Gallic acid degradation B. sp. KLE	GALL	100%
Region 1.2	Arginine2_Hcarbonate	Other	977,382	1,000,783	Arginine to hydrogen carbonate P. aeruginosa	ARG	66%
Region 1.3	PFOR_II_pathway	SCFA	1,049,343	1,073,035	PFOR II pathway B. thetaiotaomicron	PFORII	100%
Region 1.4	Pyruvate2acetate-formate	SCFA	1,556,463	1,579,699	Pyruvate to acetate-formate E. coli	PFL_acetate	100%

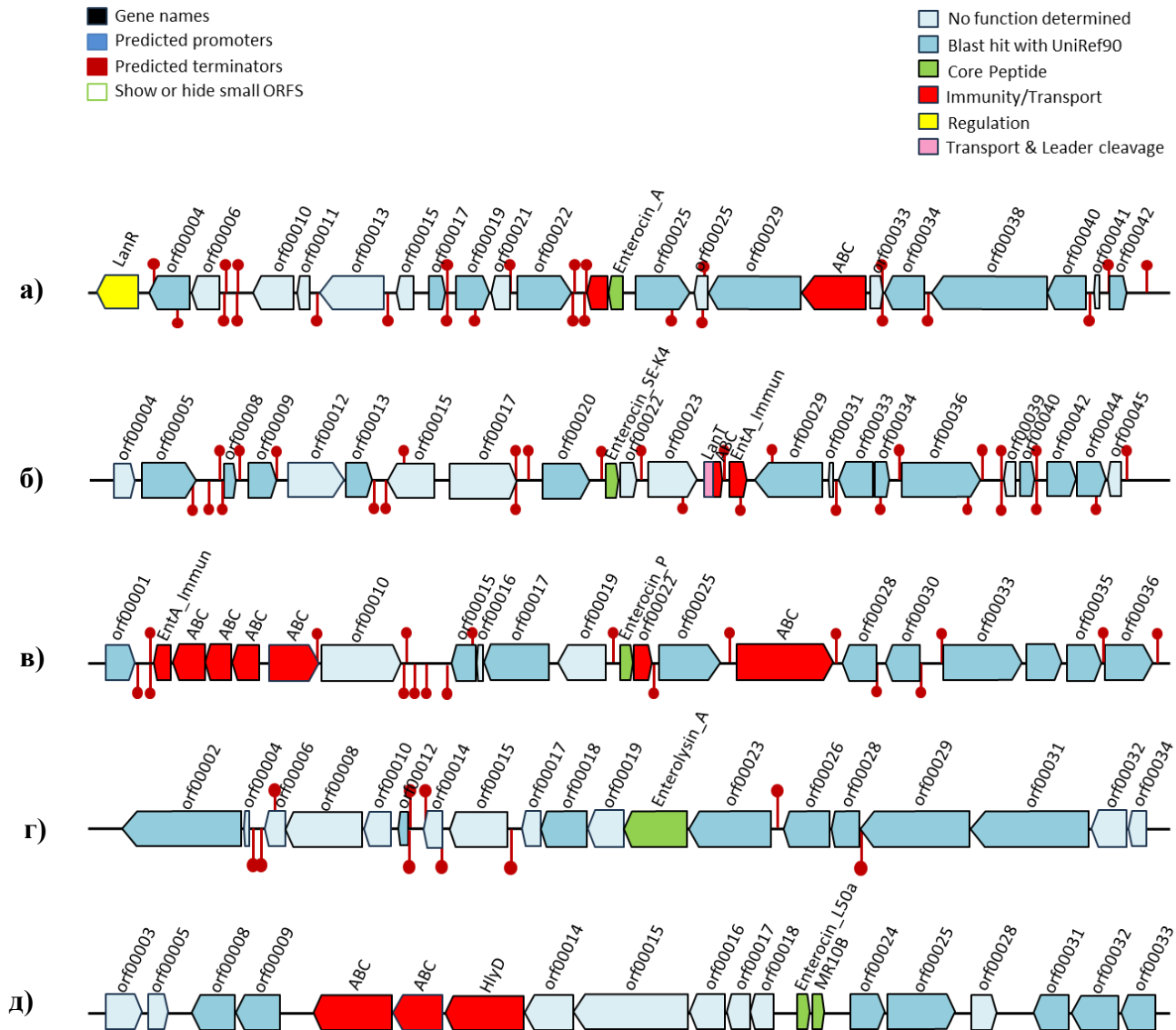
Рис. 3.6. Кластери генів первинного метаболізму, ідентифіковані в геномі *Enterococcus* sp. SB12. <https://gutsmash.bioinformatics.nl/>

Метаболічні можливості бактерій також можуть визначати їхню конкурентну здатність у мікробіомі та сприяти синтезу антимікробних сполук, зокрема бактеріоцинів. За результатами біоінформаційного аналізу у геномі штаму SB12 було виявлено декілька кластерів генів синтезу бактеріоцинів, які належать до різних функціональних класів, а також кластер генів ПКС III типу (1,628,521-1,669,675 п.н.), а саме кластер генів циклічних лактонових аутоіндукторних пептидів (рис. 3.7.). Цей кластер розташовується на хромосомі штаму і його роль може полягати в забезпеченні бактеріальної комунікації [240].

Region	Type	From	To	Most similar known cluster	Similarity	Compact view
Region 19.1	cyclic-lactone-autoinducer	1	15,643			<input type="checkbox"/>
Region 23.1	T3PKS	1	39,055			<input type="checkbox"/>

**Рис. 3.7.** Кластер генів циклічних лактонових аутоіндукторних пептидів, ідентифікований в геномі штаму SB12.  
<https://antismash.secondarymetabolites.org/#!/start>

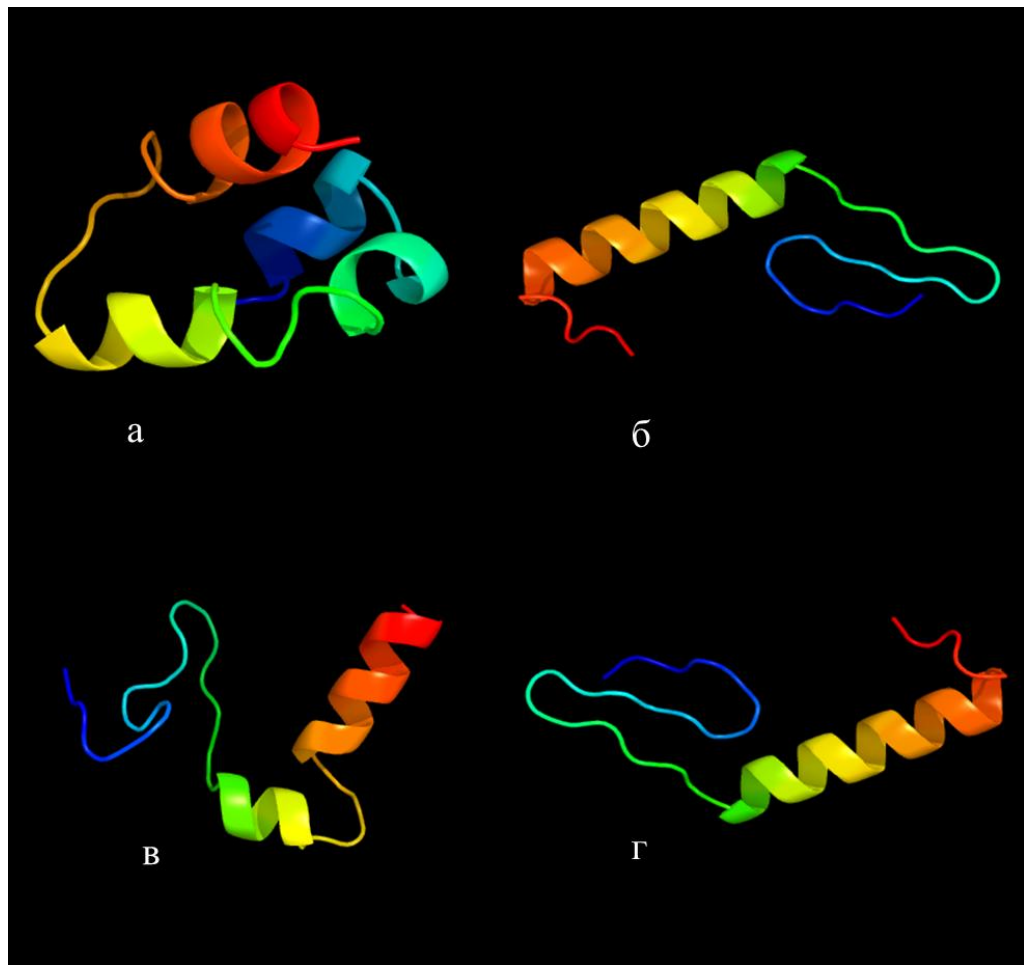
Також на хромосомі штаму SB12 виявлено кластер генів синтезу ентероцину А (81,2% ідентичності). На плазміді 1 в свою чергу було виявлено гени синтезу ентероцину SE-K4 (95,2% ідентичності), ентероцину Р (91,2% ідентичності) та ентеролізину А (62,3% ідентичності), а на плазміді 2 - кластер генів ентероцину L50a (86,2% ідентичності) (рис. 3.8.). Ентероцин А, ентероцин L50a, ентероцин Р та ентероцин SE-K4 належать до бактеріоцинів II класу – малих термостабільних пептидів, які характеризуються високою термостійкістю та антимікробною активністю переважно проти грампозитивних бактерій. Ентеролізін А відноситься до III класу бактеріоцинів, які являють собою великі білкові молекули.



**Рис. 3.8.** Кластери генів бактеріоцинів у геномі *Enterococcus* sp. SB12, передбачені за допомогою веб-сервера BAGEL4: а) ентероцин А; б) ентероцин SE-K4; в) ентероцин Р; г) ентеролізін А; д) ентероцин L50a.

Було проведено моделювання просторової структури пептидів на основі амінокислотної послідовності ідентифікованих бактеріоцинів за допомогою сервера Phyre 2.2 (рис. 3.9.). Встановлено, що структура ентероцину А, ентероцину L50a, ентероцину Р та ентероцину SE-K4 подібні до педіоцину PA-1, ентероцину 7A та курвацину А. Така подібність пояснюється високою консервативністю просторової структури бактеріоцинів класу II, які часто демонструють гомологію до інших представників групи педіоцин-подібних пептидів. Для ентеролізіну А не вдалося отримати достовірної моделі структури,

що може бути пов'язаним із відсутністю відповідних шаблонів у структурних базах даних для цього типу білків.



**Рис. 3.9.** Імовірна структура ідентифікованих бактеріоцинів, змодельована за допомогою програми Phyre 2.2: (а) ентероцин L50a, (б) ентероцин SE-K4, (в) ентероцин А, (г) ентероцин Р.

<https://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>

### **Підсумки до підрозділу 3.1.3.**

1. У геномі SB12 виявлено кластери метаболізму галової кислоти, а також ферментів залучених в метаболізмі пірувату та аргініндеїміназного шляху, що свідчить про метаболічний потенціал штаму і здатність до адаптації в умовах кишкового середовища.
2. Ідентифіковано кластери генів синтезу бактеріоцинів та антибіотиків класу III PKS. На хромосомі було виявлено кластер генів ентероцину А

та III PKS, тоді як на плазмідах - ентероцину L50a, ентероцину P та ентероцину SE-K4. Більшість ідентифікованих бактеріоцинів відносяться до II класу і лише ентеролізін A до III класу.

3. Моделювання просторової структури ідентифікованих бактеріоцинів за допомогою сервера PyMol 2.2 показало їх структурну подібність до пептидоцин-подібних пептидів. Для ентеролізіну A достовірну модель отримати не вдалося.

Результати досліджень наведені вище опубліковано у статті [249] матеріалах конференції [374, 376].

### 3.2. Порівняння та філогенетичний аналіз геному *Enterococcus* sp. SB12 з геномами інших штамів *Enterococcus faecium*

Філогенетичний аналіз *Enterococcus* sp. SB12 був проведений для оцінки філогенетичного положення цього штаму в межах роду *Enterococcus*. На основі аналізу 779 однокопійних ортологічних генів встановлено, що штам *Enterococcus* sp. SB12 формує кладу зі штамми, які зазвичай використовуються як пробіотичні культури (CICC 20430), а також зі штамми, виділеними з різних джерел, таких як сир з Чорногорії (INF9, INF12, INF39), ферментоване козяче (YM46-4) і верблюже молоко (XJ49307), йогурт (XJ24308) і пилкові гранули з бджолиних вуликів (EFD 1) (рис. 3.10).

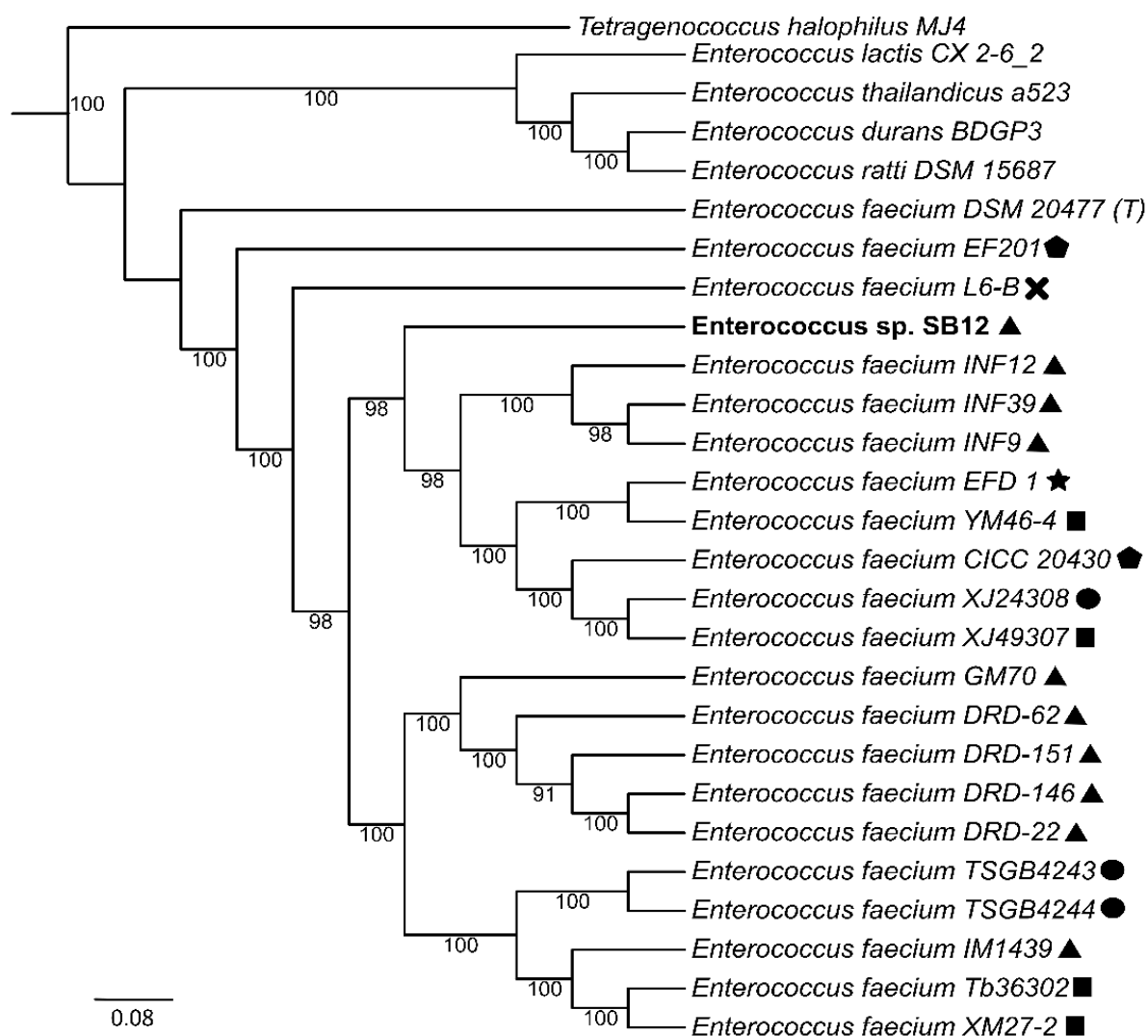


Рис. 3.10. Філогенетичне дерево *Enterococcus* spp. на основі 779 однокопійних ортологічних генів. Немарковані штами представляють типові штами виду. Символи вказують на джерело або функцію кожного штаму:

трикутник - штами, виділені з сиру; квадрат - штами, виділені з молока; коло - штами, виділені з йогурту; п'ятикутник - штами, що використовуються як пробіотики; зірка - штам, виділений з бджолиного вулика; хрест - потенційно патогенний штам. Штам *Tetragenococcus halophilus* MJ 4 використовували як аутгрупу. Смуга, 0,08 замінив нуклеотидну позицію.

Сестринська група до класу *Enterococcus* sp. SB12 включає штами, виділені з сиру фета (DRD-22, DRD-62, DRD-146, DRD-151), аргентинського сиру (GM70), традиційного сербського сиру (IM1439), ферментованого молока Яка (Tb36302), кобилячого молока (XM27-2) та традиційного турецького йогурту (TSGB4243, TSGB4244). Ці штами відіграють ключову роль у ферментації різних молочних продуктів і мають значний пробіотичний потенціал.

Для порівняльного геномного аналізу штаму SB12 було використано три штами ентерококів (*E. faecium* INF12, *E. faecium* YM46-4 та *E. faecium* CICC 20430), які за результатами філогенетичного аналізу геному є близькими до штаму SB12 та утворюють спільну кладу. Ці штами були виділені з молочнокислих продуктів. Додатково для порівняння було включено типовий штам *E. faecium* DSM20477, загальновизнаний пробіотичний штам, що входить до складу пробіотика BIO-THREE®, штам *E. faecium* T110 [255], патогенний штам *E. faecium* ATCC 700221, *vanA*-позитивний фекальний ванкоміцин-резистентний ентерококовий ізолят з високим рівнем резистентності до кількох антибіотиків [221] (табл. 3.5.).

Таблиця 3.5.

Порівняння *Enterococcus* sp. SB12 з іншими штамами *Enterococcus faecium*.

Властивості	<i>Enterococcus</i> sp. SB12	<i>Enterococcus faecium</i> DSM 20477	<i>Enterococcus faecium</i> INF12	<i>Enterococcus faecium</i> YM46-4	<i>Enterococcus faecium</i> CICC 20430	<i>Enterococcus faecium</i> T110	<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 700221
Джерело походження	Сир	Типовий штам (є в кишечнику людини і тварин)	Розсольні сири	Ферментоване козине молоко	Кефір	Пробіотик	Клінічний ізолят
Реєстраційний номер (Хромосома/плазмід(и))	CP175675/CP175676, CP175677	CP118955/CP118956	NZ_JAАНСЕ00000000	NZ_PGRI00000000	NZ_WOTU00000000	CP006030/CP006031	CP014449/ CP014450, CP014451, CP014452
Розмір геному (Mb)	2,69	2,67	2,65	2,59	2,56	2,74	2,9
Кількість плазмід	2	1	Не визначалось	Не визначалось	Не визначалось	1	3
Кількість мобільних генетичних елементів	383	220	263	211	214	175	484
Кількість факторів вірулентності	16	18	18	11	11	13	20
Гени антибіотикорезистентності	<i>AAC(6')-Ii</i> , <i>vanY</i> у <i>vanB</i> -кластері, <i>efrA</i> , <i>eatAv</i>	<i>AAC(6')-Ii</i> , <i>vanY</i> у <i>vanB</i> -кластері, <i>efrA</i> , <i>efmA</i>	<i>AAC(6')-Ii</i> , <i>vanY</i> у <i>vanB</i> -кластері, <i>efrA</i> , <i>eatAv</i>	<i>AAC(6')-Ii</i> , <i>vanY</i> у <i>vanB</i> -кластері, <i>efrA</i> , <i>eatAv</i>	<i>AAC(6')-Ii</i> , <i>vanY</i> у <i>vanB</i> -кластері, <i>efrA</i> , <i>eatAv</i>	<i>AAC(6')-Ii</i> , <i>vanY</i> у <i>vanB</i> -кластері, <i>efrA</i> , <i>msrC</i>	<i>AAC(6')-Ii</i> , <i>vanY</i> у <i>vanB</i> -кластері; <i>vanHA</i> , <i>vanY</i> у <i>vanA</i> -кластері; <i>vanZ</i> у <i>vanA</i> -кластері; <i>vanS</i> у <i>vanA</i> <i>efrA</i> , <i>efmA</i> , <i>dfrG</i> , <i>APH(3')-IIIa</i> , <i>aad(6)</i> , <i>SAT-4</i> , <i>Erm-B</i>
Кластери генів бактеріоцинів	Ентероцин А, Ентероцин SE-K4, Ентероцин Р, Ентеролізін А, Ентероцин L50a	Ентеролізін А, Ентеролізін В, Ентеролізін Р, Бактеріоцин UviВ, Ентеролізін А	Ентеролізін А	Ентерноцин Р	Ентероцин Р	Ентероцин А, Ентероцин Р, Ентеролізін А	Ентероцин А, Бактеріоцин Т8, Ентероцин SE-K4, Ентеролізін А

Порівняльний геномний аналіз показав, що розмір геному досліджуваних штамів суттєво не відрізнявся, коливаючись від 2,56 Мб (*E. faecium* CICC 20430) до 2,9 Мб (*E. faecium* ATCC 700221). Примітно, що штам з найбільшим розміром геному (*E. faecium* ATCC 700221) містив три плазмиди, на відміну від штамів з меншими геномами, які мали меншу кількість плазмід або взагалі не мали плазмід. Патогенний штам *E. faecium* ATCC 700221 не тільки мав найбільший розмір геному, але й містив найбільшу кількість мобільних генетичних елементів (484), порівняно зі значно меншою кількістю у пробіотичних та потенційно пробіотичних штамів (від 175 до 383).

Аналогічна тенденція спостерігалася і для факторів вірулентності: *E. faecium* ATCC 700221 кодує 20 таких факторів, що є найбільшою кількістю серед проаналізованих штамів. Що стосується генів антибіотикорезистентності, то біоінформаційний аналіз підтвердив їх наявність у всіх штамів, найпоширенішими з яких виявилися *AAC(6')-II*, *vanY* у складі кластеру *vanB* та *efrA*. Крім того, на відміну від типових і патогенних штамів, SB12 і жоден з потенційних пробіотичних штамів не містить ген *efmA*, який кодує мультифункціональний ефлюксий насос. Однак патогенний штам продемонстрував розширений набір генів резистентності, включаючи детермінанти стійкості до ванкоміцину (*vanHAX*, *vanY* та *vanZ*). Детальний аналіз факторів вірулентності у *Enterococcus* sp. SB12 виявив наявність 12 генів, які також були виявлені у *E. faecium* T110, добре охарактеризованого штаму, що використовується в BIO-TRI®. Важливо, що жоден з детермінант вірулентності високого ризику, які зазвичай асоціюються з патогенністю, таких як *IS16*, *esp* (ентерококовий поверхневий білок), *gylE* (желатиназа), *asal* (агент агрегації), *cyl* (цитолізін) і *hyl* (гіалуронідаза/гемолізін), не були виявлені ні в SB12, ні в T110. Ця відсутність підтверджує генетичну безпеку штаму SB12 і додатково відрізняє його від клінічно значущих високовірулентних *E. faecium*.

Гени, що кодують бактеріоцини, були ідентифіковані як у потенційних пробіотичних (*E. faecium* T110), так і патогенних (*E. faecium* ATCC 700221) штамів. У штамів *Enterococcus* sp. SB12 та *E. faecium* T110 наявність генів

ентероцину А, ентоцину Р та ентолізину А підкреслює їхні корисні антимікробні властивості, які можуть бути використані для пригнічення патогенних мікроорганізмів. Примітно, що *Enterococcus* sp. SB12 мав найбільшу кількість кластерів генів біосинтезу бактеріоцинів, що підкреслює його потенціал як пробіотика з сильною антимікробною активністю. У той же час, у патогенних штамів, таких як *E. faecium* ATCC 700221, гени бактеріоцинів також присутні, проте їх роль може бути неоднозначною, сприяючи як конкуренції за екологічні ніші, так і підвищенню патогенності.

### **Підсумки до розділу 3.2.**

1. За допомогою філогенетичного аналізу з'ясовано, що штам *Enterococcus* sp. SB12 утворює спільну кладу пробіотичними ентерококами та з ентерококами, виділених з молочнокислих продуктів.
2. Порівняльний геномний аналіз показав, що штам SB12 генетично близький із потенційно пробіотичними штамми, не містить найбільш небезпечних генів вірулентності та має кластери генів бактеріоцинів, що підкреслює його безпеку та потенціал для застосування як пробіотика.

Результати досліджень наведені вище опубліковано у статті [249].

### 3.3 Мікробіологічна характеристика штаму *Enterococcus* sp. SB12

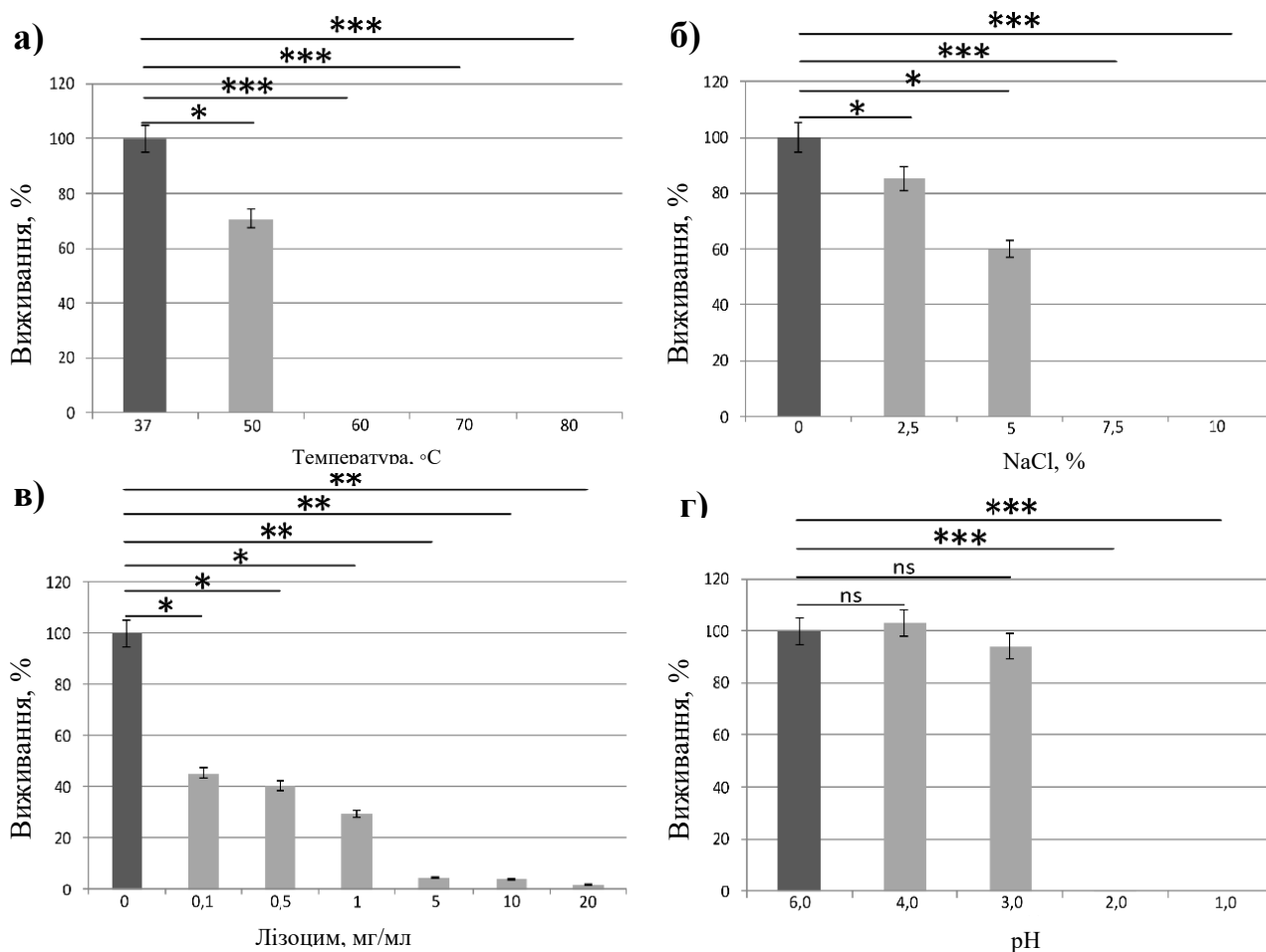
#### 3.3.1. Оцінка виживання штаму SB12 у несприятливих умовах навколишнього середовища та підбір оптимальних параметрів його промислового застосування.

Як зазначалося раніше, штам *Enterococcus* sp. SB12 було виділено з сиру бринза, традиційного продукту харчування Карпатського регіону. Враховуючи його походження та ідею використання в якості пробіотика, було важливо оцінити здатність досліджуваного штаму витримувати потенційні умови виробництва, які включають використання високих температур при пакуванні препаратів та умови кишково-шлункового тракту при безпосередньому потраплянні бактерії в організм. Крім того, коли йдеться про виробництво продукту з високим вмістом солі, такого як сири (що містять 1,5–7% NaCl), важливо, щоб штам був солестійким. Щоб оцінити його стійкість, ми змодельовали ці умови за допомогою різних температур, солоності, ферменту лізоциму та кислого рН середовища.

Щоб оцінити термостійкість SB12, штам піддавали впливу температур 50 °C, 60 °C, 70 °C і 80 °C. За температури 50 °C виживання штаму SB12 становило  $70,6 \pm 5\%$  порівняно з контролем (37 °C). Однак підвищення температури експозиції до 60 °C різко знижувало виживання досліджуваних мікроорганізмів, кількість яких становило лише  $0,1 \pm 0,05\%$ . При температурах 70 °C та 80 °C виживання штаму SB12 становило 0% (рис. 3.11а).

Для оцінки стійкості до засолення були обрані концентрації NaCl 2,5%, 5,0%, 7,5% і 10%. Оптимальний ріст *Enterococcus* sp. SB12 спостерігався при 2,5% і 5% NaCl (рис. 3.11б), тоді як при 7,5% і 10% NaCl не було виявлено життєздатних бактерій порівняно з контролем.

Здатність SB12 виживати за дії лізоциму і низького рівня рН показано на рисунках 3.11в і 3.11г. За концентрації лізоциму 0,1 мг/мл, 0,5 мг/мл та 1,0 мг/мл виживання штаму SB12 становило 45,45%, 40,34% та 29,55% відповідно. Збільшення концентрації лізоциму до 10 мг/мл та 20 мг/мл різко знижувало виживання штаму до 4,07% та 2,09%, відповідно, порівняно з контролем.



**Рис. 3.11.** Вплив на виживання штаму *Enterococcus* sp. SB12: а) температури; б) різних концентрацій NaCl; в) лізоциму; г) низьких значень pH. Усі дані наведено як середнє значення  $M \pm SEM$  з трьох повторень. \* -  $P < 0,05$ ; \*\* -  $P < 0,01$ ; \*\*\* -  $P < 0,001$ ; «ns» - значення  $p$  вище 0,05.

Щодо виживання штаму SB12 в умовах низьких значень pH, які моделюють умови шлунку, виявлено, що значення pH 3,0 і 4,0 суттєво не впливали на його виживання –  $103,0 \pm 3\%$  і  $94,1 \pm 4\%$ , відповідно. Однак вплив pH 2,0 помітно знижував виживання *Enterococcus* sp. SB12 до  $0,12 \pm 0,1\%$  порівняно з контролем, тоді як за pH 1,0 виживання не спостерігалось.

Також було досліджено вплив різних значень pH на накопичення біомаси SB12 з метою визначення оптимальних умов культивування (табл. 3.6.).

Таблиця 3.6.

Вплив pH на приріст біомаси *Enterococcus* sp. SB12

Початковий рН	0	2	4	8	16	24
	годин	години	години	годин	годин	годин и
6	+	±	+++	+++	+++	+
7	+	+	++	+++	++++	++
9	±	±	+	++	+++	++++

± - дуже слабкий ріст; + - слабкий ріст; ++ - помірний ріст; +++ - інтенсивний ріст; ++++ - дуже інтенсивний ріст. Інтенсивність росту оцінювали візуально за щільністю газону на агарі через встановлені часові проміжки.

Встановлено, що ріст штаму спостерігався при всіх досліджених значеннях рН=6,0, 7,0 та 9,0, однак проягом перших 4 годин найгірший ріст спостерігався при рН=9,0. Значне зниження кислотності у середовищах відбулося з 8 до 24 годин культивування до 4,2, 4,4 та 6,0, відповідно. Зниження рівня рН під час культивування можна пояснити накопиченням органічних кислот, зокрема молочної та оцтової у процесі метаболізму *Enterococcus* sp. SB12, що є типовим для молочнокислих бактерій. Найкращий ріст продемонструвала культура в групі з рН=7,0 через 16 годин культивування, тоді як у групах з рН=6,0 та 9,0 швидкість росту була майже однаковою. Слід зазначити, що через 24 години культивування найвищу швидкість росту біомаси штаму продемонструвало середовище зі значенням рН= 9,0, тоді як при рН=6,0 ця швидкість була найнижчою.

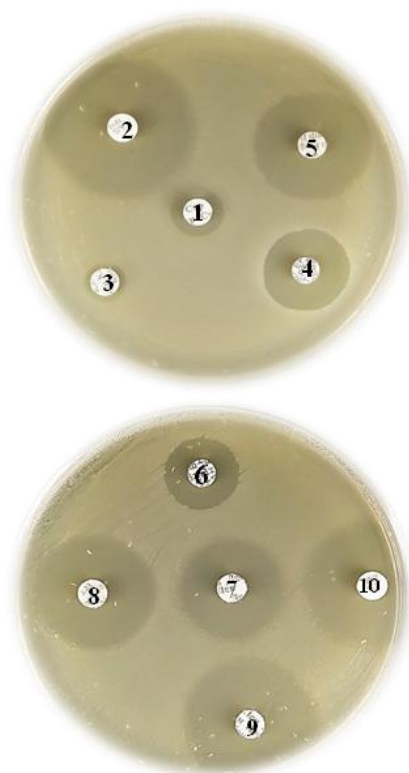
### Підсумки до підрозділу 3.3.1 .

1. Штам *Enterococcus* sp. SB12 виживає за температури до 60 °С, концентрацій NaCl – до 5% та лізоциму – до 20 мг/мл , а також значенні рН=2 у середовищі.
2. Найбільш сприятливими умовами для росту штаму *Enterococcus* sp. SB12 є лужне середовище (рН=7,0-9,0) при якому через 16 годин культивування спостерігається найбільш інтенсивний ріст культури.

Результати досліджень наведені вище опубліковано у статті [249] матеріалах конференцій [245, 247].

### 3.3.2. Оцінка безпеки та антагоністичних властивостей штаму SB12

Відповідно до результатів біоінформатичного аналізу були виявлені деякі гени резистентності у геномі штаму *Enterococcus* sp. SB12 (див розділ 3.1.2). Фенотипову чутливість до плевромутилінів у даній роботі не визначали, оскільки ця група антибіотиків застосовується переважно у ветеринарній медицині та не входить до стандартних панелей для оцінки безпеки харчових або пробіотичних штамів бактерій [106, 316, 345]. SB12 продемонстрував чутливість до усіх використаних у дослідженні антибіотиків: ванкоміцину (глікопептид) й ампіциліну ( $\beta$ -лактамний антибіотик), тетрацикліну (тетрацикліни), левіміцитину (фенікол), пеніциліну ( $\beta$ -лактамний антибіотик), еритроміцину (макролідний антибіотик), рифампіцину (рифаміцини) й аміноглікозидних антибіотиків (канаміцину, стрептоміцину, гентаміцину) (рис. 3.12.).



Антибіотик	Зона пригнічення (мм)
Ампіцилін (10 мкг)	30 $\pm$ 2
Ванкоміцин (30 мкг)	18 $\pm$ 1
Гентаміцин (10 мкг)	10 $\pm$ 1
Канаміцин (30 мкг)	10 $\pm$ 1
Стрептоміцин (30 мкг)	12 $\pm$ 1
Еритроміцин (15 мкг)	20 $\pm$ 1
Тетрациклін (10 мкг)	25 $\pm$ 1
Левіміцитин (Хлорамфенікол) (30 мкг)	22 $\pm$ 1
Рифампіцин (10 мкг)	26 $\pm$ 2
Пеніцилін (10 мкг)	26 $\pm$ 1

**Рис. 3.12.** Визначення стійкості до антибіотиків *Enterococcus* sp. SB12 диско-дифузійним методом: 1 – стрептоміцин, 2 – ампіцилін, 3 – канаміцин, 4 – еритроміцин, 5 – рифампіцин, 6 – гентаміцин, 7 – левіміцитин, 8 – тетрациклін, 9 – пеніцилін, 10 – ванкоміцин.

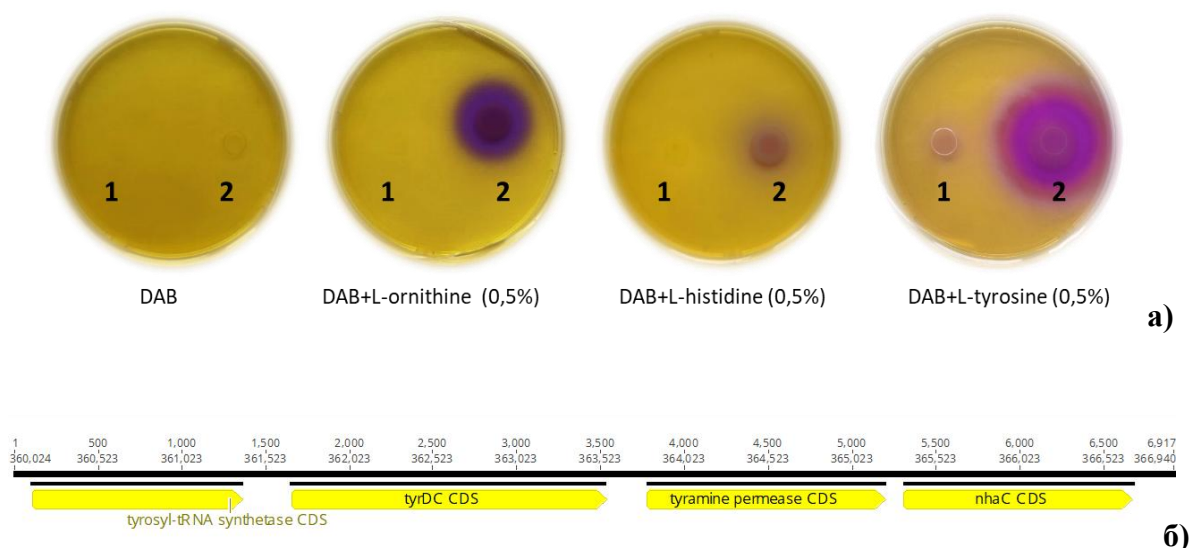
Однією з найважливіших властивостей потенційних пробіотичних штамів є їхня здатність пригнічувати патогенні мікроорганізми шляхом синтезу речовин з антимікробною дією. З огляду на це, було досліджено здатність штаму *Enterococcus* sp. SB12 пригнічувати ріст низки тест-культур патогенних грампозитивних і грамнегативних бактерій та грибів. Штам SB12 виявив антимікробну активність щодо досліджуваних штамів *B. subtilis* ATCC 31324, *M. smegmatis* MC<sup>2</sup>155, *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 та *P. aeruginosa* ATCC 9027 (рис. 3.13.); однак не був активним проти дріжджа *C. albicans* ATCC 885-653. Ця активність може бути зумовлена продукуванням одного або декількох ідентифікованих у геномі штаму бактеріоцинів.



Тест-культура	Зона інгібування, мм
<i>Staphylococcus aureus</i>	10
<i>Bacillus subtilis</i>	15
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	16
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
<i>Escherichia coli</i>	16
<i>Candida albicans</i>	-

**Рис. 3.13.** Антимікробна активність *Enterococcus* sp. SB12. Зони пригнічення показані внизу таблиці.

Одним із критеріїв оцінки безпечності штаму для використання, зокрема ентерококів, є відсутність синтезу токсичних сполук, таких як біогенні аміни. Штам *Enterococcus* sp. SB12 було перевірено на активність гістидинової, орнітинової та тирозинової декарбоксилаз за допомогою удосконаленого середовища DAB. На середовищах з гістидином та орнітином не було виявлено утворення кольорового ореолу (синього або фіолетово-пурпурного) навколо зони росту штаму SB12 (рис.3.14а). Це свідчить про відсутність підлучнення середовища, що є індикатором утворення БА. Однак було виявлено, що *Enterococcus* sp. SB12 слабо декарбоксилює тирозин, що призводить до утворення обмеженої кількості тираміну.



**Рис. 3.14.** Скринінг продукування біогенних амінів: 1 - *Enterococcus* sp. SB12 та 2 - *Escherichia coli* ATCC 25922: а) скринінг продукції біогенних амінів *in vitro*; б) кластер генів тирозиндекарбоксилази в геномі *Enterococcus* sp. SB12. DAB - середовище Decarboxylase Agar Base (Himedia, Індія). *Enterococcus* sp. SB12

З огляду на це, ми додатково провели геномний аналіз з метою ідентифікації кластерів генів декарбоксилаз гістидину, орнітину та тирозину у штамі SB12. Кластерів генів, відповідальних за біосинтез гістаміну або путресцину, виявлено не було.

Однак було ідентифіковано генний кластер, залучений до біосинтезу тираміну, що узгоджується з результатами скринінгу БА на середовищі DAB. Цей кластер мав типову організацію та містив гени, що кодують тирозиндекарбоксилазу (tyrDC), тирозил-tРНК-синтетазу (tyrS), ймовірну тирозин/тирамін-пермеазу (tyrP) та Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-антипортер (nhaC) (рис. 3.14б) [186].

### **Підсумки до підрозділу 3.3.2.**

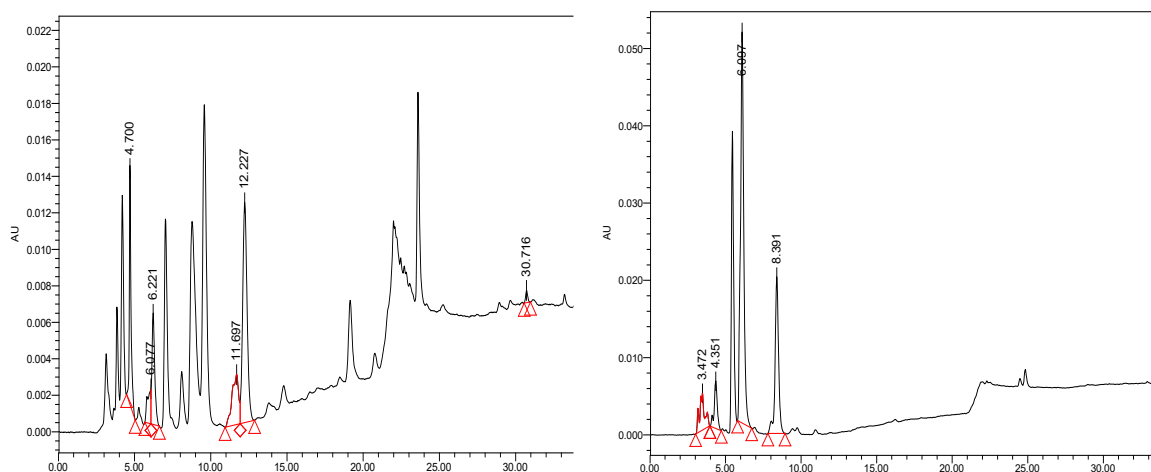
1. Досліджуваний штам *Enterococcus* sp. SB12 чутливий до аміноглікозидів, β-лактамів, глікопептидів, феніколів та тетрациклінів.
2. *Enterococcus* sp. SB12 володіє активністю проти грамнегативних (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) та грампозитивних бактерій (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium smegmatis*).
3. Встановлено, що штам SB12, незважаючи на наявність у геномі кластера генів, відповідального за біосинтез тираміну, продукує тирамін лише у низьких концентраціях.

Результати досліджень наведені вище опубліковано у статті [249] матеріалах конференцій [246, 376].

### 3.4 Аналіз метаболічного потенціалу *Enterococcus* sp. SB12

#### 3.4.1. Вітамінний та амінокислотний склад біомаси штаму SB12

Для оцінки біотехнологічного потенціалу штаму *Enterococcus* sp. SB12 було проведено дослідження його здатності до синтезу та накопичення вітамінів і амінокислот. Отримані ВЕРХ-хроматограми показали наявність у біомасі штаму таких вітамінів: тіамін (вітамін B1), рибофлавін-5-фосфат (вітамін B2), нікотинова кислота та нікотинамід (вітамін B3/PP), піридоксин (вітамін B6), кальцію пантотенат (вітамін B5) і аскорбінова кислота (вітамін C) (рис. 3.15). Найвищий вміст серед досліджених вітамінів було встановлено для кальцію пантотенату (1,90 мг/г біомаси), далі за концентрацією розташовувалися піридоксин (0,90 мг/г) та нікотинова кислота (0,59 мг/г). Найнижчий вміст спостерігався для рибофлавін-5-фосфату і становив лише 0,0063 мг/г біомаси.



Vitamins	Compound form	Retention times (min)	Biomass content (mg/g)
B <sub>1</sub>	Thiamine hydrochloride	4.7	0.26
B <sub>2</sub>	Riboflavin-5-phosphate	30.7	0.0063
B <sub>3</sub>	Nicotinic acid	12.2	0.59
B <sub>5</sub>	Calcium pantothenate	21.9	1.90
B <sub>6</sub>	Pyridoxine	8.3	0.90
PP	Nicotinamide	6.2	0.22
C	Ascorbic acid	4.3	0.029

Рис. 3.15. ВЕРХ-хроматограми вітамінного складу біомаси *Enterococcus* sp. SB12 (довжина хвилі детектування 265 нм) та концентрації виявлених вітамінів.

Для поглибленої характеристики метаболічної активності штаму також було досліджено зміни амінокислотного складу поживного середовища та біомаси після 24 годин культивування. Встановлено, що *Enterococcus* sp. SB12 активно трансформував амінокислотний склад середовища, що свідчить про інтенсивний перебіг процесів синтезу та споживання амінокислот(табл. 3.7).

Таблиця 3.7.

Концентрація амінокислот у культуральному середовищі та біомасі *Enterococcus* sp. SB12 після 24 годин культивування.

Амінокислоти	Концентрація середовищі до культивування (мг/мл)	Концентрація в середовищі після культивування (мг/мл)	Концентрація в біомасі (мг/г)
Taurine	0.03540	0.86632	2.815301
Arginine	0.55212	0.06301	0.212351
Asparagine	0.18674	0.19257	0.168963
Glutamine	0.02632	0.01780	5.341869
Citrulline	0.03554	0.03369	2.766219
Aspartate	0.03420	0.02496	1.966090
Proline	0.19940	0.23222	4.471798
Alanine	0.45259	0.46917	0.329645
Methionine	0.14655	0.14557	2.915741
Valine	0.36486	0.39705	9.265470
Tryptophan, Phenylalanine	and 2.04302	1.93423	0.209350
Leucine			
Cysteine	0.12401	0.56740	5.795330
Ornithine	0.70080	0.64495	0.895896
Lysine	0.10172	0.06284	2.815301

Найбільш виражені зміни були характерні для таурину, концентрація якого в культуральному середовищі зросла з 0,03540 до 0,86632 мг/мл. Одночасно значна кількість цієї сполуки накопичувалася в біомасі (2,82 мг/г), що може

свідчити про активні процеси синтезу та обміну сірковмісних метаболітів. На відміну від таурину, концентрація аргініну в середовищі зменшилася майже у дев'ять разів (з 0,55212 до 0,06301 мг/мл), а лізину – з 0,10172 до 0,06284 мг/мл. Таке зниження вказує на ефективне використання цих амінокислот бактеріальними клітинами для забезпечення росту та біосинтетичних процесів.

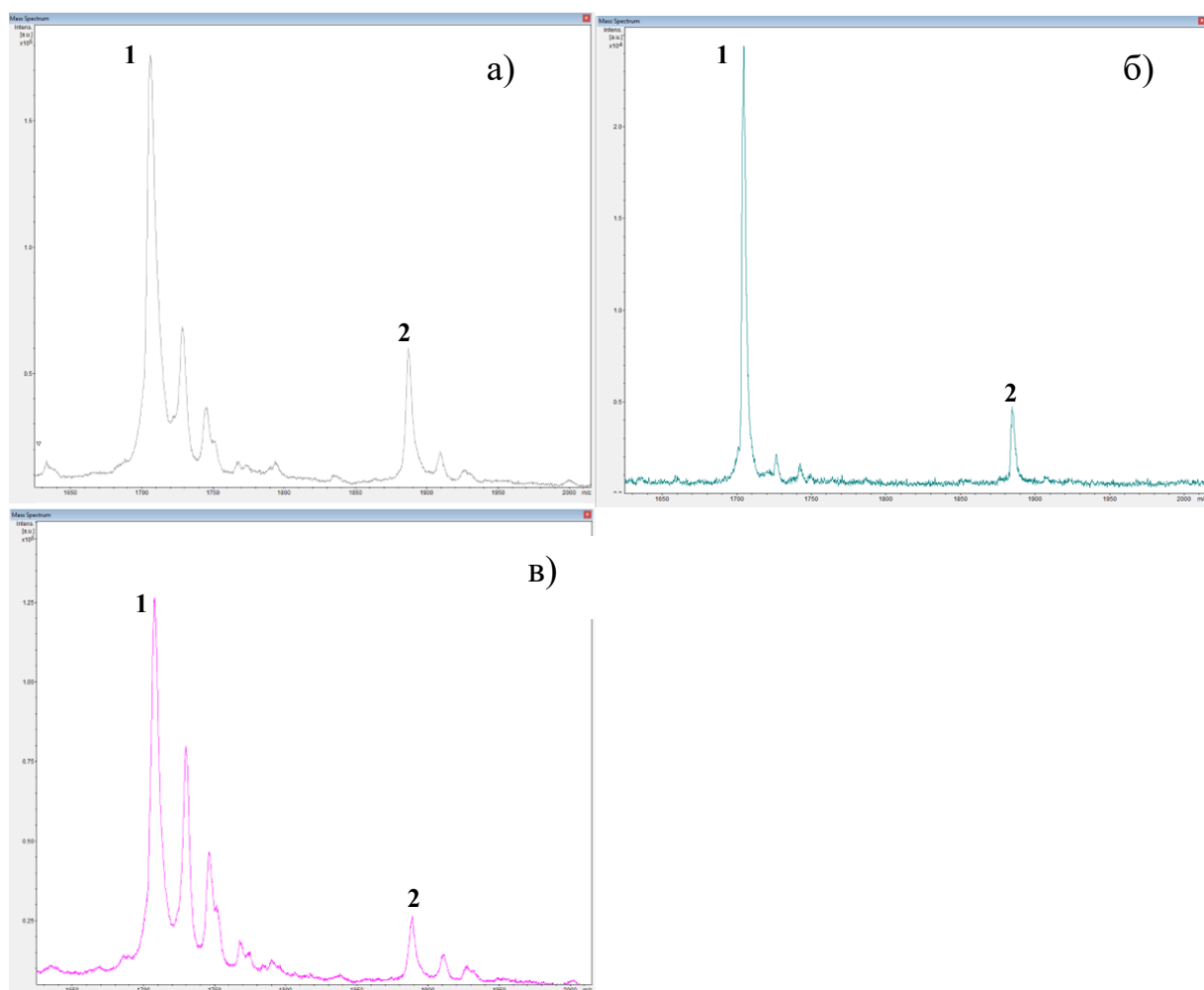
Аналіз амінокислотного складу біомаси показав, що найбільші концентрації були характерні для валіну (9,27 мг/г), цистеїну (5,80 мг/г), глутаміну (5,34 мг/г) та проліну (4,47 мг/г). Значні кількості також були виявлені для метіоніну (2,92 мг/г), таурину (2,82 мг/г), лізину (2,82 мг/г), цитруліну (2,77 мг/г) та аспартату (1,97 мг/г). Накопичення валіну, який належить до незамінних амінокислот може відобразити високу біосинтетичну активність штаму та потенційну поживну цінність його біомаси.

Загалом отримані результати вказують на інтенсивний амінокислотний метаболізм *Enterococcus* sp. SB12, що характеризується одночасним споживанням окремих амінокислот із середовища та накопиченням інших у бактеріальній біомасі.

### **3.4.2. Аналіз метаболітів *Enterococcus* sp. SB12**

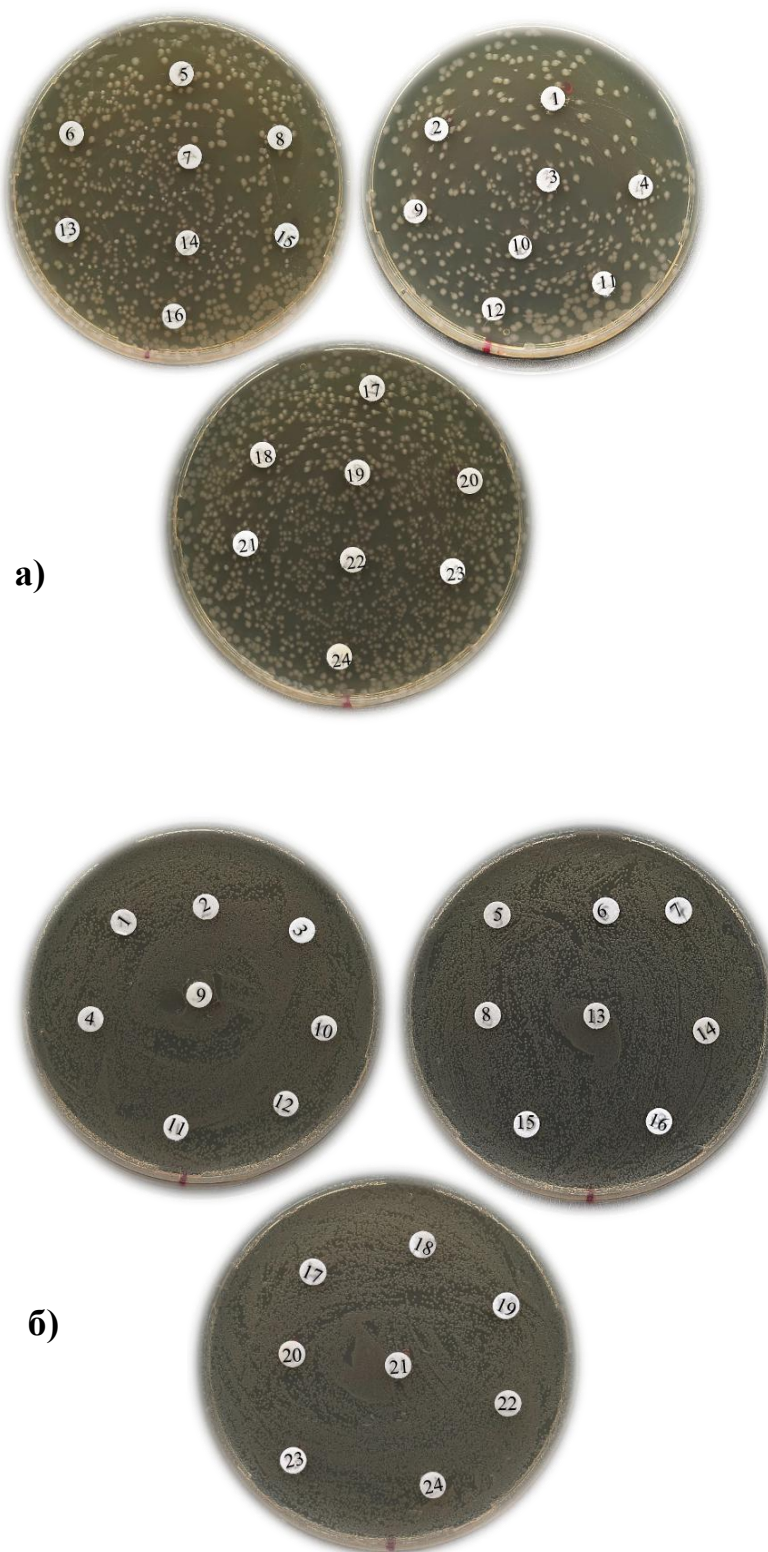
Для визначення сполук, відповідальних за антимікробну активність штаму SB12, було проведено аналіз отриманих екстрактів методами ВЕРХ-МС та MALDI-TOF. Аналіз ВЕРХ-МС був спрямований на ідентифікацію сполук, асоційованих із біосинтетичними кластерами потенційних антибіотиків, оскільки в геномі штаму було виявлено кластер PKS III типу. За результатами ВЕРХ-МС аналізу встановлено, що маси спостережуваних піків при анотації хроматограм не відповідали масам сполук, представлених у базі даних DNP (Додаток Г). MALDI-TOF мас-спектрометричний аналіз виявив два пептидні сигнали з масами 1705 та 1885 Да в двох бутанольних та одному метанольному екстрактах, одержаних при культивуванні в середовищах ВНІ та TSB, на 24 та 48 годин відповідно (рис. 3.16.). Зазначені піки також детектувалися в інших екстрактах штаму, однак фіксувалися окремо – у більшості випадків без

одночасної присутності обох сигналів. В етилацетатних екстрактах із середовищ ВНІ та TSB після 24 годин культивування був виявлений лише один пік з масою 1705 Да, тоді як після 48 годин цей сигнал не реєструвався. В екстрактах з середовища MRS не було виявлено чітких сигналів бактеріальних пептидів, що пов'язано з великою кількістю органічних компонентів, які формують фонові піки та ускладнюють аналіз MALDI-TOF. Загалом, отримані значення мас не відповідали теоретичним масам бактеріоцинів, ідентифікованих за результатами біоінформатичного аналізу геному. Ймовірно, ці піки відповідають коротким пептидам або фрагментам білків клітин.



**Рис. 3.16.** MALDI-TOF-MS аналіз метаболітів з екстрактів штаму SB12: (а), бутанольний екстракт з культуральної рідини на середовищі ВНІ, 24 години культивування (б), метанольний екстракт з біомаси на середовищі TSB, 48 годин культивування, (в) бутанольний екстракт з культуральної рідини на середовищі ВНІ, 48 години культивування; 1 –  $m/z$  1705, 2 –  $m/z$  1885.

Додатково, отримані екстракти метаболітів штаму SB12 було протестовано на активність із використанням грамнегативної *Escherichia coli* GB 2005 та грампозитивної *Bacillus subtilis*. Проте, жодної активності не було виявлено (рис. 3.17.).



**Рис. 3.17.** Результати визначення активності екстрактів *Enterococcus* sp. SB12 проти патогенів: (а) *B. subtilis*, (б) *E. coli* GB 2005 (додаток Г)

### Підсумки до розділу 3.4 .

1. Встановлено здатність *Enterococcus* sp. SB12 синтезувати та накопичувати біологічно важливі вітаміни групи В (В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, В<sub>3</sub>, В<sub>5</sub>, В<sub>6</sub>) та аскорбінову кислоту, а також активно метаболізувати амінокислоти з їх подальшим накопиченням у біомасі, зокрема валіну, глутаміну, цистеїну та проліну. Отримані дані свідчать про виражений метаболічний потенціал штаму та підтверджують його перспективність як продуцента біологічно та функціонально цінних сполук.
2. У екстрактах штаму *Enterococcus* sp. SB12 виявлено піки з масами 1705 та 1885 m/z, які з'являлися нерегулярно та переважно окремо; у середовищі MRS сигнали не реєструвалися через високий фон органічних компонентів, а загальні значення m/z не відповідали теоретичним масам бактеріоцинів, імовірно відображаючи короткі пептиди або фрагменти білків клітин.
3. Культуральні екстракти штаму на відміну від живої культури не проявляли антимікробної активності проти *E. coli* GB 2005 та *B. subtilis*, що може бути зумовленим необхідністю специфічними умовами екстракції та/або умов вирощування в рідкій культурі та потребує більш точного аналізу в майбутніх дослідженнях.
4. Виявлена здатність до синтезу вітамінів і накопичення біологічно цінних амінокислот додатково підтверджує перспективність штаму *Enterococcus* sp. SB12 для використання у пробіотичних препаратах та технологіях виробництва функціональних харчових продуктів.

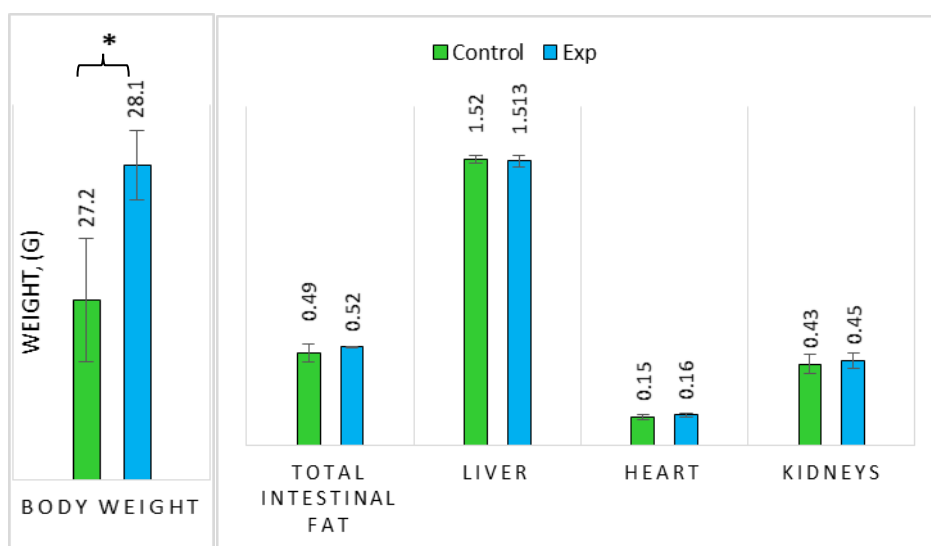
Результати досліджень, наведені вище опубліковано у статті [Viktoriia Mushynska, Stepan Tistechok, Sofia Kukuian, Ivan Roman, Oleksandr Gromyko, Iryna Slyvka, Orysia Tsisaryk, Vira Hashchyshyn, Ivan Gevkan, Oksana Shtapenko and Vasyl Syrvatka. Impact of *Enterococcus* sp. SB12 strain on gut microbiome and some biochemical parameters of mice. *Applied Microbiology*]. In press.

### 3.5. Експеримент *in vivo*: визначення впливу *Enterococcus* sp. SB12 на фізіологічні параметри мишей та здатність модулювати мікробіоту кишківника

#### 3.5.1. Маса тіла та внутрішніх органів мишей після завершення експерименту

Наприкінці 29-добового експерименту встановлено статистично достовірне збільшення маси тіла мишей дослідної групи порівняно з контрольною групою. Середня маса тіла тварин, які отримували *Enterococcus* sp. SB12, становила  $28,1 \pm 0,53$  г, тоді як у контрольній групі цей показник дорівнював  $27,2 \pm 0,41$  г ( $P < 0,05$ ) (рис. 3.18).

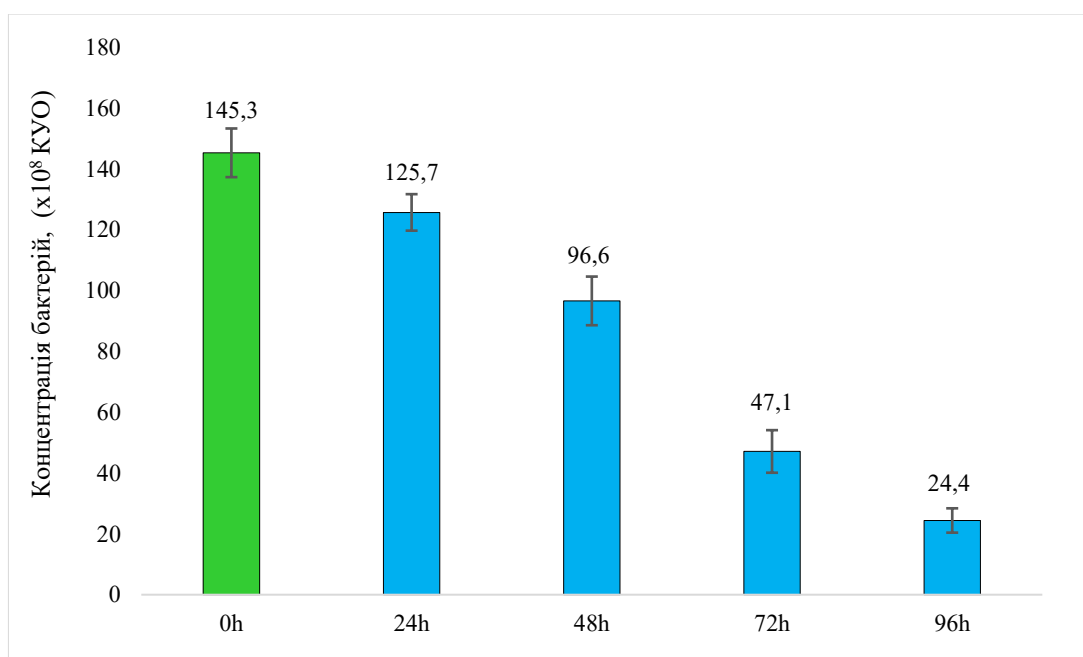
Водночас аналіз маси внутрішніх органів не виявив статистично значущих відмінностей між контрольною та дослідною групами. Маса вісцерального жиру, печінки, серця та нирок у тварин, які отримували штаму *Enterococcus* sp. SB12, не відрізнялася від відповідних показників контрольних мишей ( $P > 0,05$ ). Отримані результати показують відсутність негативного впливу досліджуваного штаму на морфофункціональний стан внутрішніх органів та жировий обмін експериментальних тварин.



**Рисунок 3.18.** Маса тіла та внутрішніх органів мишей після 29 діб введення *Enterococcus* sp. SB12. Дані наведені у вигляді середнього значення  $M \pm SEM$  ( $n = 10$ ). \* - статистично достовірна різниця порівняно з контрольною групою ( $P < 0,05$ ).

### 3.5.2. Метагеномний аналіз кишківника мишей за впливу *Enterococcus* sp. SB12

Для експерименту *in vivo* *Enterococcus* sp. SB12 вводили у формі суспензії в стерильній воді. Проте, перед цим було оцінено доцільність доставки бактерії в організм через питну воду через їх життєздатність впродовж 72-х годин. Аналіз виживання у питній воді, яка випоювалася групі дослідних мишей, виявив залежне від часу зниження кількості життєздатних клітин впродовж 96-ти годин інкубації при 20 °C (рис. 3.19.).

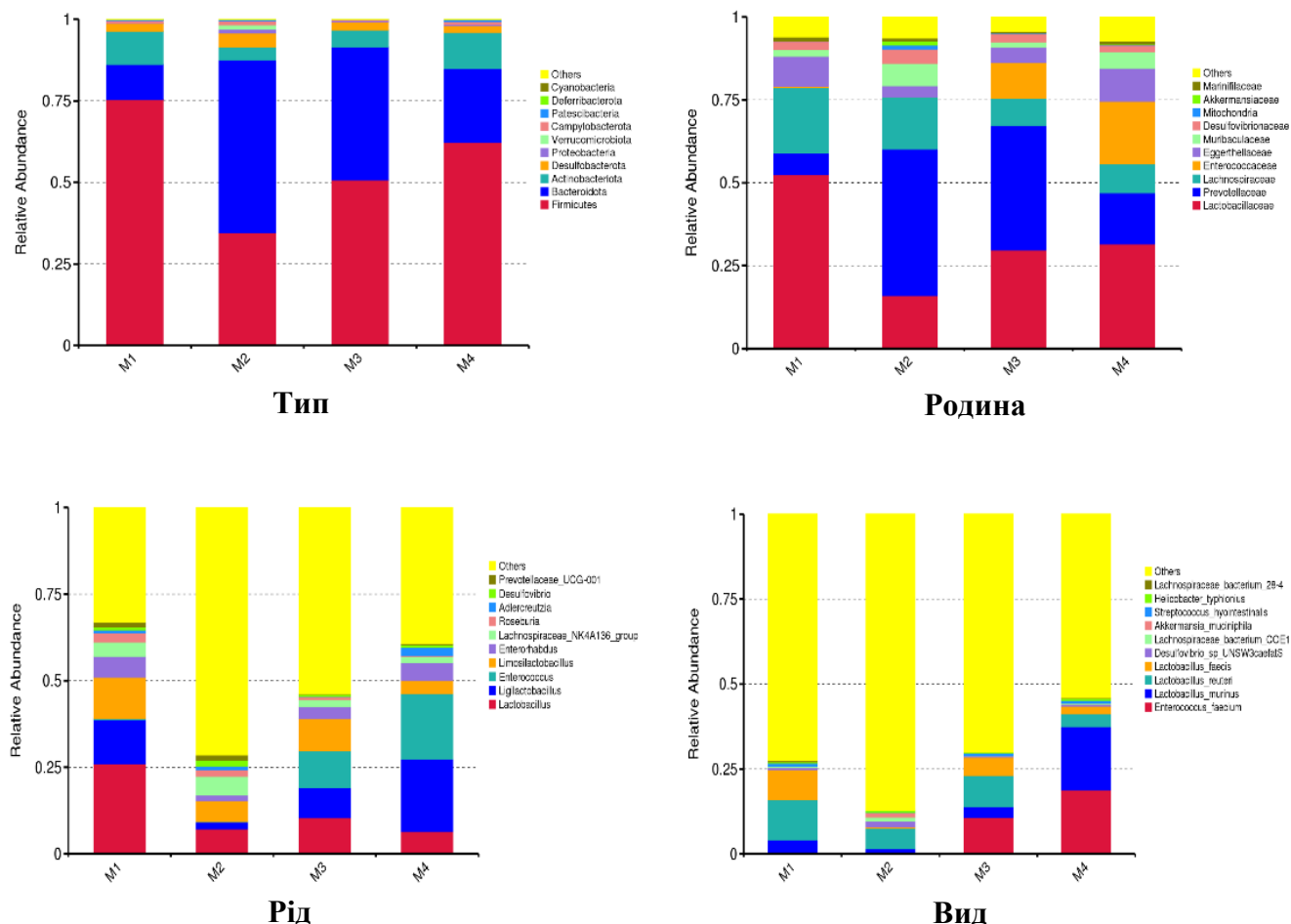


**Рис. 3.19.** Виживання *Enterococcus* sp. SB12 у воді впродовж 96-ти годин культивування.

Порівняно з початковою концентрацією ( $145,3 \times 10^8$  КУО), життєздатність бактерій знизилася до  $125,7 \times 10^8$  КУО ( $\approx 86\%$ ) через 24 години і до  $96,6 \times 10^8$  КУО ( $\approx 66\%$ ) через 48 годин інкубації. Подальше зниження спостерігалось в пізніші терміни, причому кількість життєздатних клітин зменшилася до  $47,1 \times 10^8$  КУО (приблизно 32%) через 72 години і до  $24,4 \times 10^8$  КУО (приблизно 17%) через 96 годин. Спостережуване залежне від часу зниження життєздатності *Enterococcus* sp. SB12 у питній воді узгоджується з попередніми повідомленнями, які демонструють, що ентерококи та інші молочнокислі

бактерії зберігають достатню короткочасну життєздатність у водних середовищах, незважаючи на поступову втрату здатності до культивування [115]. Однак впродовж перших 24-ох годин зберігання кількість життєздатних бактерій залишалася достатньою для підтримання ефективної мікробної дози для експерименту *in vivo*.

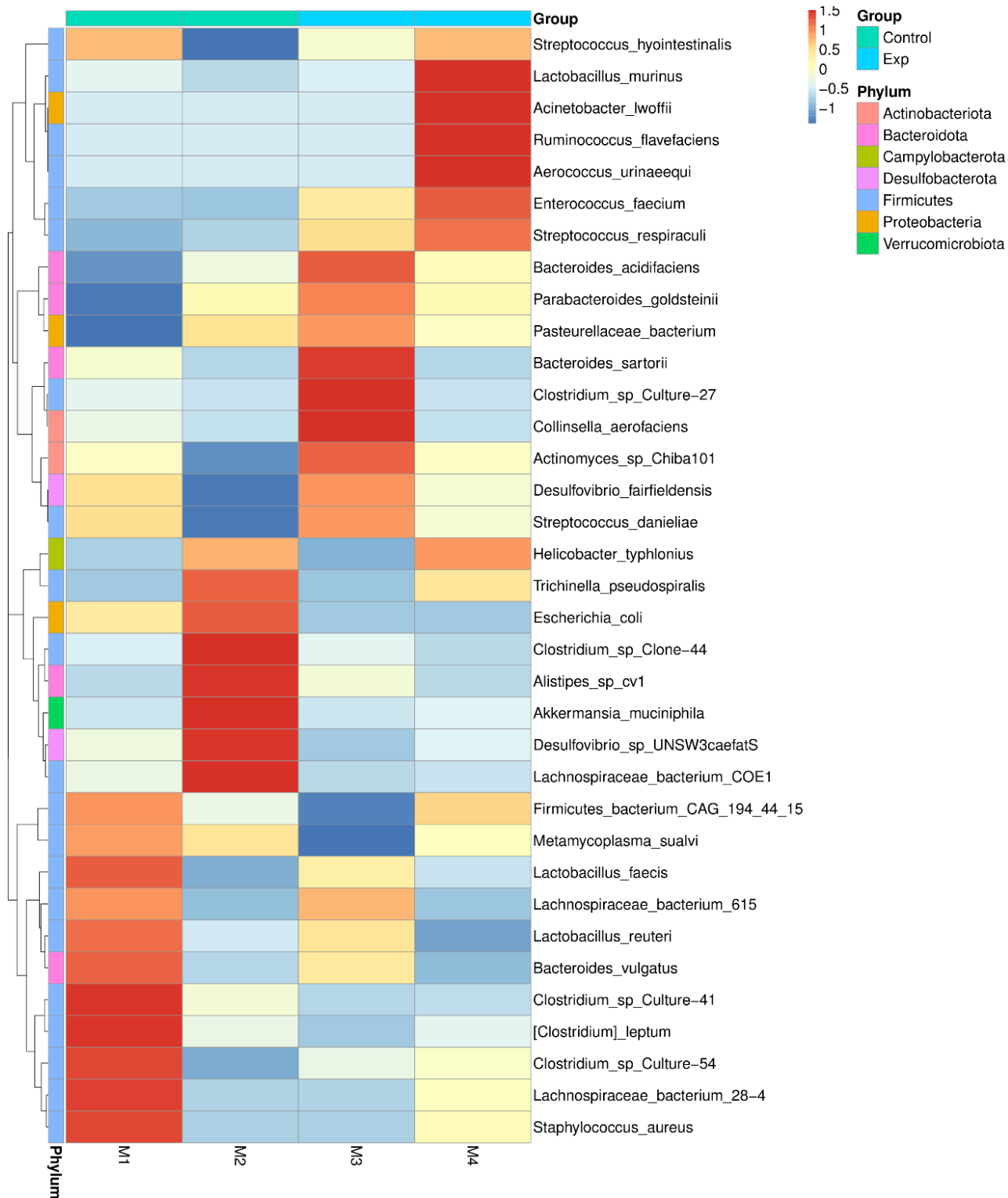
За результатами метагеномного аналізу встановлено, що мікробіом кишечника мишей представлений переважно представниками типів *Firmicutes*, *Bacteroidota*, *Desulfobacterota*, *Verrucomicrobiota*, *Actinobacteriota*, *Campylobacterota*, *Patescibacteria*, *Cyanobacteria* та *Spirochaetota*. Найбільш чисельними виявилися представники типів *Firmicutes* і *Bacteroidota*, а також родин *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Prevotellaceae* і *Lachnospiraceae* (рис. 3.20.).



**Рис. 3.20.** Метагеномний аналіз бактеріального різноманіття в кишечнику мишей. M1 та M2 – контрольні групи мишей, M3 та M4 – експериментальна група мишей.

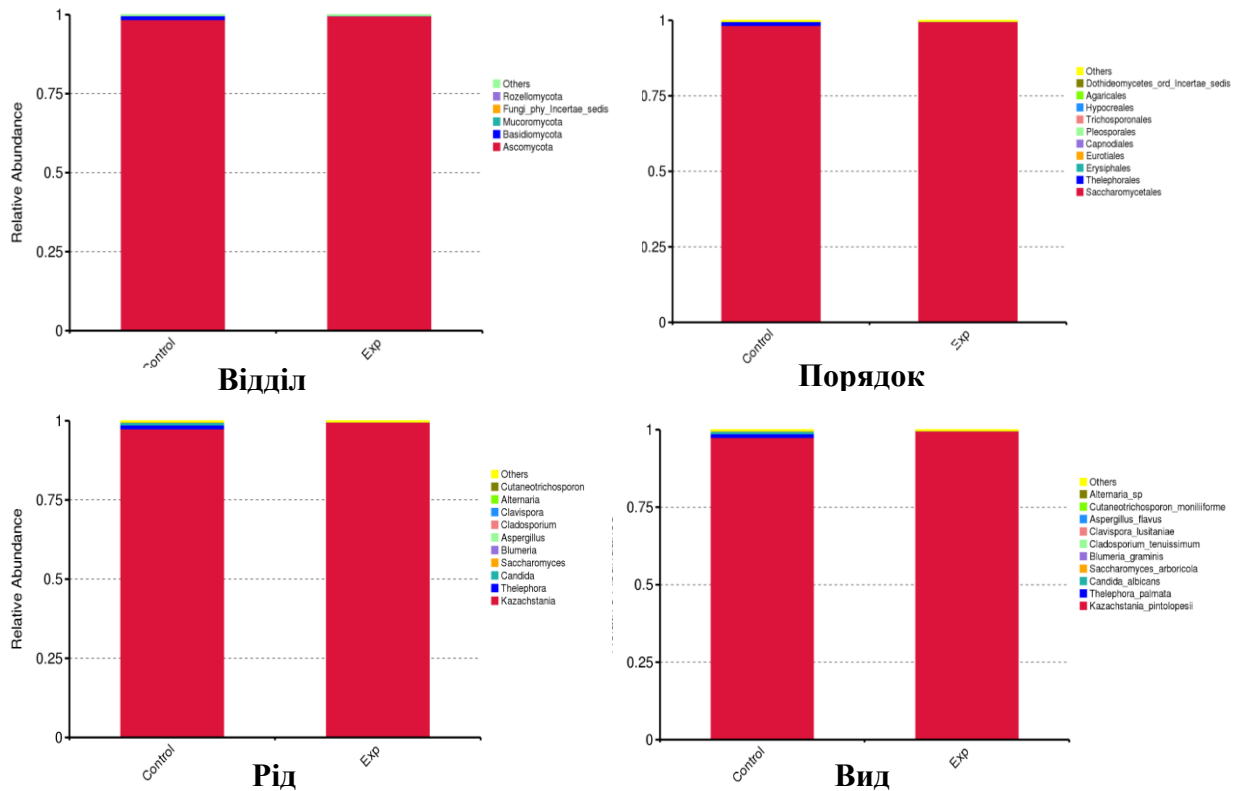
Порівняльний аналіз мікробіоти експериментальної та контрольної груп показав, що у мишей, які отримували *Enterococcus* sp. SB12, спостерігалось збільшення частки представників типів *Firmicutes*, *Actinobacteriota*, *Campylobacterota*, *Patescibacteria*, *Cyanobacteria* та *Spirochaetota*. На рівні родин відзначено зростання кількості *Streptococcaceae*, *Eggerthellaceae*, *Atopobiaceae*, *Ruminococcaceae*, *Saccharimonadaceae*, *Monoglobaceae*, *Enterococcaceae*, *Rikenellaceae*, *Prevotellaceae* та *Tannerellaceae*, а серед родів – *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Limosilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Bacteroides*, *Parvibacter*, *Alistipes* і *Streptococcus*.

Водночас у мишей експериментальної групи відзначалося зменшення або відсутність представників типів *Desulfobacterota*, *Proteobacteria*, *Chloroflexi* та *Deferribacterota*, а також родин *Desulfovibrionaceae*, *Peptococcaceae* та *Akkermansiaceae*. На рівні родів зменшувалася представленість *Blautia*, *Gordonibacter*, *Desulfovibrio*, *Akkermansia* та *Helicobacter* (рис. 3.21.).



**Рис. 3.21.** Теплова карта бактеріального різноманіття в кишечнику мишей. M1 та M2 – контрольні групи мишей, M3 та M4 – експериментальна група мишей.

Крім бактеріальної складової мікробіому було досліджено вплив штаму *Enterococcus* sp. SB12 на популяцію представників царства Грибів (рис. 3.22.). Встановлено, що у мишей експериментальної групи, порівняно з контролем, представники типів *Basidiomycota* та *Mucoromycota* були відсутні або виявлялися у незначній кількості, зокрема родів *Aspergillus*, *Pichia*, *Fusarium*, *Candida*, *Alternaria* та *Saccharomyces*. Водночас спостерігалось збільшення представленості родів *Lichtheimia* і *Psathyrella* (рис.3.22. та 3.23.).





**Рис. 3.23.** Теплова карта грибкового різноманіття в кишечнику мишей. М1 та М2 – контрольні групи мишей, М3 та М4 – експериментальна група мишей.

**Підсумки до підрозділу 3.5.2 .**

1. Штам *Enterococcus* sp. SB12 зберігає достатній рівень життєздатності у питній воді впродовж перших 24-ох годин, що забезпечує підтримання ефективної мікробної дози для поведення експерименту *in vivo*.
2. Аналіз метагеному кишечника мишей показав наявність представників роду *Enterococcus* у дослідній групі мишей, що свідчить про виживання штаму у ШКТ.
3. Дані, отримані в результаті метагеномного аналізу, вказують на збільшення кількості представників корисної мікрофлори у ШКТ та зменшення кількості умовно-патогенних мікроорганізмів.

Результати досліджень наведені вище опубліковано у статті [375] та матеріалах конференції [373, 377].

### 3.5.3. Вплив *Enterococcus* sp. SB12 на біохімічні параметри мишей

Однією з основних цілей даного дослідження було вивчення впливу нового штаму *Enterococcus* sp. SB12 на організм мишей шляхом вимірювання окремих біохімічних показників. Для цього обрали такі основні параметри: рівень глюкози, білка та холестерину в крові; показники пероксидації ліпідів (вміст гідроперекисів ліпідів та ТВА-активних продуктів), окислювальної модифікації білків, та активність каталази.

При статистичному аналізі показників крові мишей не було виявлено відмінностей між експериментальною та контрольною групами тварин за рівнем холестерину ЛПВЩ, холестерину ЛПНЩ, концентрацією глюкози та білка (табл. 3.8.). Отримані дані свідчать про відсутність порушень зазначених показників у мишей під впливом штаму *Enterococcus* sp. SB12, а також про відсутність його негативного впливу на організм тварин.

Таблиця 3.8.

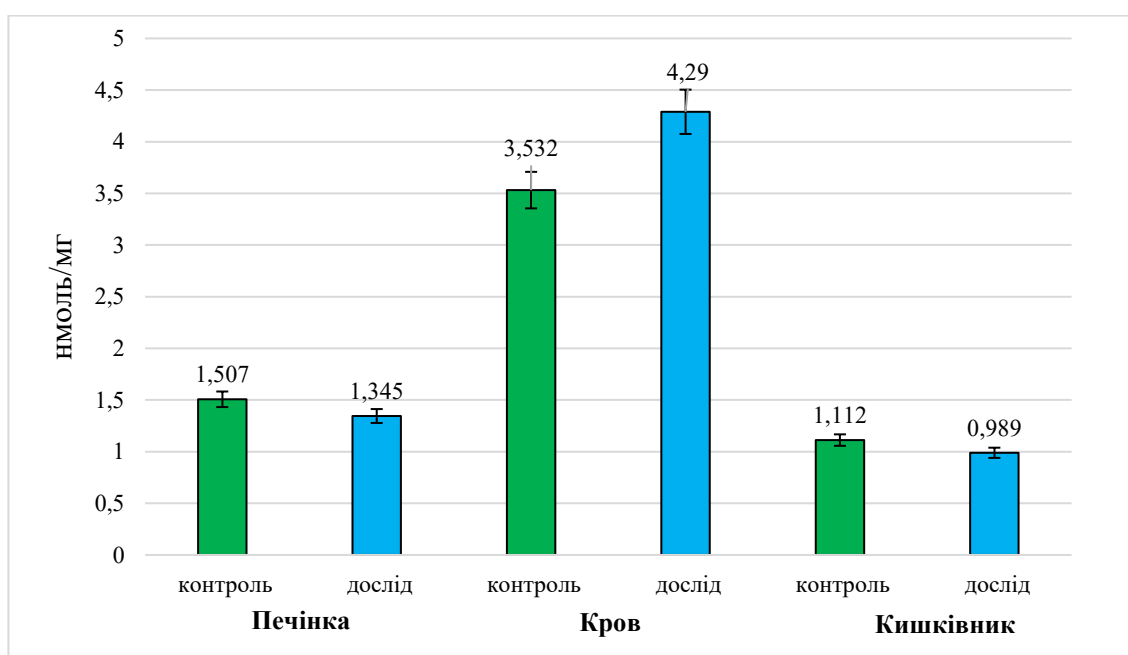
Біохімічні показники крові мишей за впливу *Enterococcus* sp. SB12, (M±SEM, n=10)

Показник	Контрольна група	Дослідна група
ЛПВЩ-холестерол, ммоль/л	1.73±0.107	1.75±0.085
ЛПНЩ-холестерол, ммоль/л	5.41±0.378	5.76±0.558
Глюкоза, ммоль/л	9.341±0.194	8.32±0.517
Загальний білок, г/л	57.3±1.60	53.4±2.61

Важливим показником потенційного токсичного впливу мікробіологічного штаму на організм-господаря є індукція окисного стресу, який пов'язаний з надмірним утворенням активних форм кисню (АФК). Підвищений рівень АФК може призвести до пошкодження клітинних мембран, органел і нуклеїнових кислот [172], що в кінцевому підсумку призводить до порушення функцій клітин і їх загибелі. Крім того, продукти розпаду, що виділяються з некротичних клітин, можуть виступати тригерами запальних процесів і аутоімунних реакцій в

організмі [171]. Реактивні форми кисню, в свою чергу, викликають гідроперекисне окислення ліпідів (ГПЛ) та окислювальні модифікації білків (ОМБ). Під час реакцій перекисного окислення ліпідів накопичуються ендogenous альдегіди, що є тригером карбонільного стресу та подальшого розвитку патологічних станів [3, 112].

Встановлено, що у тварин дослідної групи спостерігалася тенденція до зниження вмісту ГПЛ у тканинах печінки та кишківника порівняно з контрольною групою (1,345 проти 1,507 нмоль/мг білка та 0,989 проти 1,112 нмоль/мг білка відповідно). Водночас у сироватці крові відзначено підвищення рівня ГПЛ (4,290 проти 3,532 нмоль/мг білка) (рис. 3.24.).



**Рис. 3.24.** Вміст ГПЛ у крові та тканинах мишей за введення *Enterococcus* sp. SB12, нмоль/мг білка ( $M \pm SEM$ ,  $n=10$ )

Окислювальна модифікація білків генерує нові антигени та провокує імунну відповідь. Продукти такої модифікації можуть спричиняти вторинне пошкодження інших молекул і, відповідно, також сприяти подальшому розвитку оксидативному стресу в організмі [84].

Результати дослідження показують, що введення штаму *Enterococcus* sp. SB12 дослідним мишам не супроводжувалося статистично вірогідними змінами

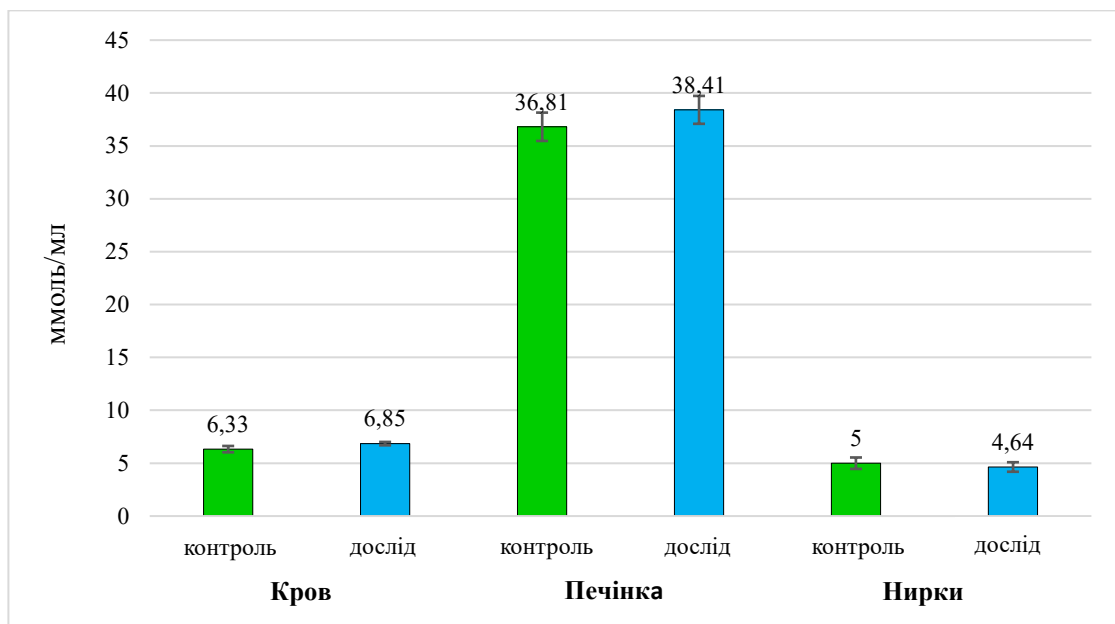
інтенсивності окислювальної модифікації білків у порівнянні з контрольною групою ( $P \geq 0,05$ ) (табл.3.9.). У тканині печінки показники карбонільних похідних залишалися на рівні контролю, тоді як у тканині кишківника спостерігалася тенденція до зниження вмісту кетоніпохідних приблизно на 25% (0,03 проти 0,04 мкмоль/мг білка)

Таблиця 3.9.

Рівень ОМБ за впливу штаму SB12, мкмоль/ мг ( $M \pm SEM$ ,  $n=10$ )

Органи		$\lambda = 274$ нм	$\lambda = 370$ нм	$\lambda = 430$ нм
Контрольна група	Печінка	7.016 $\pm$ 1.340	11.191 $\pm$ 0.747	5.252 $\pm$ 0.398
	Кишківник	0.09 $\pm$ 0.01	0.08 $\pm$ 0.0075	0.04 $\pm$ 0.004
Дослідна група	Печінка	7.413 $\pm$ 0.383	10.421 $\pm$ 0.772	5.645 $\pm$ 0.468
	Кишківник	0.10 $\pm$ 0.02	0.06 $\pm$ 0.007	0.03 $\pm$ 0.003

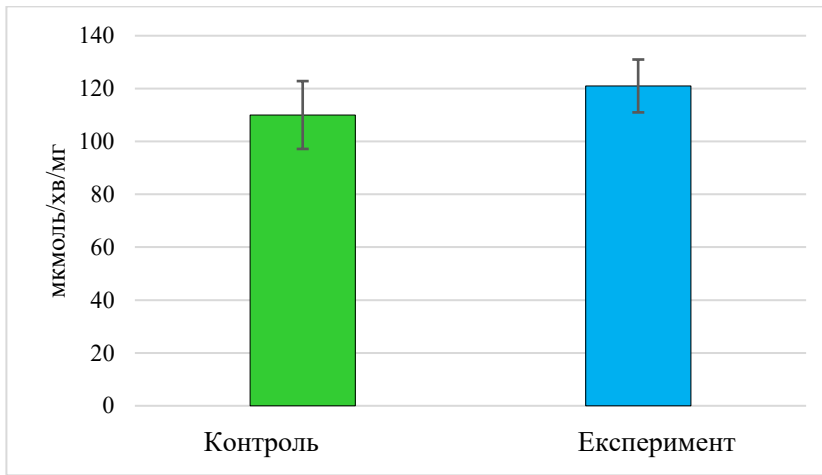
Важливим етапом оцінки впливу нового штаму є дослідження інтенсивності процесів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ). Накопичення продуктів ПОЛ, зокрема ТБК-активних сполук, може призвести до порушення проникності та функціональної цілісності клітинних мембран. Тому стабільність цього показника при введенні потенційного пробіотика свідчить про відсутність цитотоксичної дії та здатність підтримувати гомеостаз клітини макроорганізму [225]. У цьому дослідженні, аналіз вмісту ТБК-активних продуктів у сироватці крові, а також у гомогенатах печінки та нирок не виявив статистично значущих відмінностей між контрольною та дослідною групою тварин (рис.3.25.).



**Рис. 3.25.** Вміст ТБК-активних продуктів у крові та тканинах мишей за введення *Enterococcus* sp. SB12, ммоль/мл ( $M \pm SEM$ ,  $n=10$ )

Ефективність застосування пробіотику значною мірою визначається здатністю штаму підтримувати або посилювати ферментативну ланку антиоксидантного захисту організму, не викликаючи при цьому виснаження його метаболічних ресурсів. Важливим показником стабільності антиоксидантного захисту є активність каталази - ферменту, що забезпечує швидку нейтралізацію пероксидних сполук у тканинах. Моніторинг її активності дозволяє оцінити наявність або відсутність системного напруження метаболічних шляхів у відповідь на введення екзогенного чинника.

В результаті дослідження встановлено, що активність каталази у дослідних мишей після введення штаму SB12 не зазнавала вірогідних змін порівняно з контролем ( $P \geq 0,05$ ), хоча простежувалася незначна тенденція до її підвищення (рис.3. 26.).



**Рис. 3.26.** Активність каталази у крові мишей за введення *Enterococcus* sp. SB12, мкмоль/хв/мг ( $M \pm SEM$ ,  $n=10$ )

### Підсумки до підрозділу 3.5.3.

1. Введення штаму *Enterococcus* sp. SB12 не спричиняло негативного впливу на фізіологічні показники мишей та не призводило до розвитку патологічних змін. Статистичний аналіз показників крові мишей засвідчив, що введення SB12 не спричиняло достовірних змін рівнів холестерину ЛПВЩ та ЛПНЩ, глюкози та білка. У тканинах та крові дослідних мишей не було виявлено інтенсифікації процесів ПОЛ й ОМБ та зростання активності каталази.

Результати досліджень наведені вище опубліковано у [375].

## РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Серед кишкової мікробіоти молочнокислі бактерії (МБК) визнані провідними факторами позитивного впливу на здоров'я як людей, так і тварин, будучи постійними та функціонально важливими мешканцями шлунково-кишкового тракту [12]. МБК не тільки тісно пов'язані з фізіологією своїх організмів-господарів, але й мають значне біотехнологічне значення. Вони відіграють вирішальну роль у виробництві ферментованих продуктів, пробіотичних препаратів та інших промислово цінних біопродуктів із широким застосуванням у харчовій, сільськогосподарській та оздоровчій біотехнологіях [18, 33].

Рід *Enterococcus* займає особливе місце серед МБК завдяки своєму подвійному значенню в харчовій та біотехнологічній промисловості. Окремі штами, зокрема штами *Enterococcus faecium*, беруть участь у ферментації різних традиційних продуктів харчування та все частіше досліджуються завдяки своєму пробіотичному потенціалу, виробництву бактеріоцинів та інших біоактивних сполук, що мають промислове значення [149]. Проте через здатність ентерококів спричиняти нозокоміальні інфекції, а також бути носіями детермінант вірулентності та патогенності, постає потреба в ретельному дослідженні та перевірці на безпечність потенційних штамів-кандидатів [159, 223]. Досягнення сучасної молекулярної біології, включаючи повногеномне секвенування, порівняльну геноміку та біоінформатичний аналіз, тепер дозволяють глибоко досліджувати штами-кандидати на геномному рівні, сприяючи ідентифікації генів та шляхів, відповідальних за пробіотичні властивості, стійкість до стресу та виробництво цінних метаболітів [189].

Сучасні дослідження акцентуються на вивченні біотехнологічного потенціалу молочнокислих бактерій та розширення можливостей до їх використання в тваринництві та харчовій промисловості. Тому частіше використовуються підходи спрямовані на ізоляцію нових штамів з малодосліджених або специфічних екологічних ніш, оскільки такі середовища

характеризуються унікальними фізико-хімічними умовами та складними мікробними взаємодіями внаслідок чого мікроорганізми можуть набувати відмінні метаболічні властивості і синтезувати нові сполуки. Тому метою даної роботи стало дослідження штаму *Enterococcus* sp. SB12, який було ізольовано з овечої бринзи регіону Українських Карпат. Традиційні ферментовані продукти, зокрема сири, є природним джерелом різноманітних молочнокислих бактерій, які можуть мати цінні властивості, а деякі активно застосовуються у харчовій промисловості та фармакології. Тому можна припустити, що цей штам є потенційно безпечним для організму хазяїна і його можна розглядати як об'єкт для подальших досліджень у напрямку створення пробіотичних препаратів. До того ж вивчення біологічних властивостей штаму *Enterococcus* sp. SB12 може посприяти розширенню уявлень про різноманіття молочнокислих бактерій природного походження Карпатського регіону і перспективи їхнього використання.

На першому етапі дослідження, ми провели секвенування та біоінформатичний аналіз геному штаму SB12 для отримання загальної іноформації про організацію його генетичного апарату та скринінг генів, пов'язаних з стійкістю до антибіотиків, патогенністю та факторами вірулентності. Наявність таких генів можуть сприяти поширенню цих властивостей серед інших мікроорганізмів шляхом горизонтального переносу генів тому їх наявність є важливою оцінкою безпечності штаму для подальшого використання. Організація геному SB12 є досить типовою для ентерококів: невеликого розміру і представлена кільцевою хромосомою та двома кільцевими плазмідами. Характерним є наявність великої кількості мобільних генетичних елементів, які визначають генетичну мінливість, адаптивність ентерококів і поширеність в різноманітних екологічних нішах. У хромосомі та плазміді 1 штаму SB12 виявлено по 3 ділянки фага. У хромосомі, дві ділянки інтактних профагів містили повний набір структурних регуляторних та лізисних генів, що вказує на їх можливість переходити у літичний цикл та формувати активних фагів; сумнівна ділянка хромосоми, у свою чергу, може бути дефектною,

оскільки включає лише окремі структурні та регуляторні гени. У плазміді 1 виявлено теж 3 профагові ділянки, але в двох з них відсутні ключові структурні білки, що утруднює формування повноцінних фагів, а в третій наявні лише окремі гени, що може свідчити про її не функціональність. Виявлена ділянка CRISPR у плазміді 1 може обмежувати інфікування чужорідною ДНК, але не нівелює можливості геному залишатися мобільним у межах бактерії чи між клітинами. Таким чином, можна сказати, що *Enterococcus* sp. SB12 має досить динамічний геном та потенціал до горизонтального переносу генів.

Згідно функціональної анотації геному, виявлено, що більшість білків, які синтезує штам, задіяні в процесах реплікації, репарації та транскрипції ДНК, а також трансляції білків і забезпечують таким чином високу генетичну стабільність SB12 і підтримку базових функцій у клітині. Наступну по чисельності групу складають білки транспорту та метаболізму вуглеводів, що може засвідчувати метаболічну гнучкість штаму, його здатність використовувати різні джерела вуглеводів і таким чином можливість адаптовуватись до різних середовищ проживання, зокрема до молочних продуктів.

За допомогою біоінформатичних застосунків виявлено присутність у геномі даного ізоляту детермінант антибіотикорезистентності та вірулентності. Зокрема, штам SB12 містив гени стійкості до аміноглікозидних, глікопептидних, макролідних та плевромутилінових антибіотиків. Проте, SB12 продемонстрував високу чутливість до антибіотиків усіх цих груп, в першу чергу до ключових для підтвердження його безпеки – ампіциліну та ванкоміцину, що засвідчує про нефункціональність цих генів, ідентифікованих у геномі; та невисоку чутливість до аміноглікозидів (гентаміцин, стрептоміцин і канаміцин) [328], що є загальною особливістю ентерококів.

Ідентифікація 14 генів, пов'язаних з патогенністю у *Enterococcus* sp. SB12 ставить під сумнів потенційну безпеку штаму. Однак самої наявності цих генів недостатньо для підтвердження патогенності штаму. Зокрема, було встановлено, що CspA (99,4% ідентичності) функціонує як глобальний транскрипційний

регулятор, що бере участь у репресії катаболізму вуглецевих сполук [231], тоді як *WxL locusC* (89,8%) - пов'язаний зі стресовою відповіддю на вплив солі жовчі та патогенезом ендокардиту. Крім того, ідентифікація генів, залучених до модифікації РНК (*rnc*, *rnjB*, *rny*), та геліказ DEAD-бокс (*cshA*, *cshB*) підкреслює потенційну участь штаму в процесингу РНК, у регуляції транскрипції та адаптації клітин до стресових умов, тобто у функціях, які є критично важливими для виживання бактерій у різних середовищах, і не обов'язково пов'язані з патогенністю [307].

Також було ідентифіковано 16 генів, пов'язаних з факторами вірулентності, які беруть участь в адгезії, формуванні біоплівки та імуномодуляції. Багато генів, класифікованих як фактори вірулентності, згідно літературних даних, зустрічаються у коменсальних та пробіотичних штамів, і можуть зумовлювати їх адаптацію до навколишнього середовища, а не обов'язково сприяти патогенності [130]. Ген *ast* є найбільш часто ідентифікованим геном вірулентності серед ізолятів *E. faecium* (86,6%), і його точна роль у патогенезі інфекції *E. faecium* залишається невизначеною. Однак, деякі дослідження вказують на те, що продукт цього гену є компонентом мікробної поверхні, здатним розпізнавати молекули адгезивного матриксу [251]. Решта ідентифікованих факторів вірулентності, зокрема ACI49670, ACI49673, ACI49668, *pilA*, ACI49672, *bopD*, *plr/gapA*, ACI49669 та EFMU0317\_RS16950 кодують білки різних типів пілінів і, таким чином, беруть участь в процесах адгезії та колонізації ентерококів в організмі. Виявлений ген *efaA* також бере участь у процесі адгезії, але, як відомо, викликає ендокардит. Ген *efaAfm* (*E. faecium* antigen A), за даними Zhong et al. [368], забезпечує адгезію до клітинних стінок і кодує білки - рецептори марганцю, які необхідними для виживання та життєдіяльності мікроорганізмів [270]. Фактори вірулентності *cpsA/uppS* та *cpsB/cdsA* входять до складу оперону *cps*, який бере участь у біосинтезі капсульних полісахаридів, здатних модулювати імунну відповідь організму. Водночас ці гени не є критично необхідними для формування капсули та не забезпечують безпосередню експресію капсульних полісахаридів [144, 145, 337].

Фактори вірулентності *srt1*, *bee2* і *bee3* пов'язані з процесом формування біоплівки.

Загалом, більшість факторів вірулентності, ідентифікованих у геномі *Enterococcus* sp. SB12, не становлять значної загрози, але їх наявність поряд з генами, асоційованими з патогенністю вимагає ретельного вивчення безпечності використання цього штаму, що є ціллю даної роботи.

Не менш важливою ознакою безпеки штаму є відсутність синтезу токсичних сполук, таких як біогенні аміни. Основним шляхом утворення біогенних амінів у харчових продуктах є мікробне декарбоксілювання вільних амінокислот. Гістамін, путресцин та тирамін, вважаються найбільш небажаними в харчових продуктах через їхні токсичні властивості [25]. Наше дослідження показало, що штам SB12 не здатний декарбоксілювати гістидин та орнітин і, отже, не може синтезувати гістамін або путресцин. Однак він слабо декарбоксілює тирозин, що призводить до утворення обмеженої кількості тираміну. Геномний аналіз додатково засвідчив присутність в штамі SB12 лише кластера генів тирозину. Тирамін здебільшого міститься у ферментованих продуктах, включаючи ковбаси та сир [25], і в незначних кількостях не сприяє псуванню продукту, а навпаки визначає певні специфічні смакові властивості. Тому відсутність синтезу гістаміну та путресцину, поряд з незначним виробництвом тираміну, вказує на нетоксичність штаму SB12 та його можливе використання, зокрема у виробництві молочнокислих продуктів.

Метаболічна активність пробіотичних бактерій відіграє важливу роль у підтриманні кишкового гомеостазу, зокрема через участь у метаболізмі поживних речовин, синтезі біоактивних сполук і регуляції енергетичного обміну [33]. Наявність кластерів генів первинного метаболізму визначає здатність бактерії ефективно використовувати різні субстрати та продукувати метаболіти, що беруть участь у взаємодії з макроорганізмом і мікробіотою кишечника. Ми також виявили кластери первинного метаболізму в геномі нашого штаму. Серед них були присутні ключові гени метаболічних шляхів анаеробних бактерій, без яких їхнє існування неможливе, а також кластер генів, відповідальних за

деградацію галової кислоти. Цей кластер представляє значний інтерес, оскільки пірогалол, похідне галової кислоти, має значний антиоксидантний та протираковий потенціал [105]. Ідентифікація в геномі штаму *Enterococcus* sp. SB12 генів, залучених до основних шляхів первинного метаболізму, також свідчить про наявність у мікроорганізму повного набору метаболічних систем, необхідних для енергетичного обміну, росту та синтезу клітинних компонентів.

Біоінформатичний аналіз також може ідентифікувати гени, відповідальні за корисні функції пробіотичного штаму, такі як синтез вторинних метаболітів, що допомагають пригнічувати патогени у шлунково-кишковому тракті [283]. Ентерококи характеризуються синтезом бактеріоцинів, які вважаються можливою альтернативою антибіотикам для вирішення проблеми антибіотикорезистентності [6, 77]. Ми виявили п'ять кластерів генів синтезу бактеріоцинів у геномі штаму SB12, а саме: ентероцин А, ентероцин SE-K4, ентероцин Р, ентеролізін А та ентероцин L50, та кластер III типу полікетидсинтазних антибіотиків, що вказує на потенційну антибіотичну активність цього штаму та значний потенціал його для промислового та фармацевтичного використання [333]. Кластери генів PKS III типу є найпростішим з усіх класів PKS, які в останні роки привертають до себе все більшу увагу завдяки різноманітності сполук, що продукуються (халкони, пірони, акридони, флороглюциноли, стильбени та резорцинові ліпіди), їх широкому поширенню, відносно простій структурі та легкості генетичних маніпуляцій [201]. В геномі SB12 присутній кластер генів циклічних лактонових аутоіндукторів, який розглядається як перспективний об'єкт біотехнологічних досліджень завдяки його участі в регуляції утворенні біоплівки, регуляції експресії генів, пов'язаних з вірулентністю і взаємодії бактерії з клітинами хазяїна. Зокрема є ідеї щодо використання цих типів молекул у керуванні мікробними процесами, створення біосенсорних систем і розробки нових антимікробних стратегій для пригнічення патогенних мікроорганізмів без безпосереднього знищення клітини [352, 364].

Щодо ідентифкованих кластерів синтезу бактеріоцинів то потрібно зазначити, що усі вони належали до класу II окрім ентеролізіну А. Даний бактеріоцин належить до III класу, який на сьогодні залишаються найменш дослідженою групою цих антимікробних пептидів. Він є білком, що складається з 316 амінокислотних залишків і продукується бактеріями штаму *E. faecalis* LMG 2333. Порівняно з іншими ентероцинами, цей бактеріоцин характеризується відносно високою молекулярною масою, яка становить 34 501 Да. Його антимікробна активність поширюється на представників різних родів молочнокислих бактерій, зокрема *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* та *Pediococcus* [262]. Ентероцин SE-K4 синтезується бактеріями штаму *E. faecalis* K-4, ізольованого з тайського силосу, та виявляє інгібувальну активність щодо представників роду *Enterococcus*, а також *L. monocytogenes*, *Clostridium beijerinckii* і *B. subtilis*. Цей бактеріоцин має молекулярну масу близько 5,3 кДа та за амінокислотною послідовністю подібний до інших бактеріоцинів, що належать до підкласу IIa [101]. Ентероцин L50 - це бактеріоцин широкого спектру дії, складається з ентероцину L50A та ентероцину L50B [61, 257]. Ці пептиди мають 72% ідентичності послідовності і складаються з 44 і 43 амінокислот відповідно. Обидва ентероцини проявляють антибактеріальну активність незалежно, причому L50A є більш активним. 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. Цікаво, що цей бактеріоцин не продукується у випадку, коли температура інкубації *E. faecium* L 50 складає 37°C, а натомість найбільший вихід цієї антимікробної сполуки відбувається при 16 -25°C. Ентероцин P продукується штамом *E. faecium* P13, а спектр його активності включає *Lactobacillus* spp., *Pediococcus* spp., *Propionibacterium* spp. та *Enterococcus* spp., а також патогени *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *C. perfringens* та *Clostridium botulinum* [60]. Ентероцин А вперше був ідентифкований у 1996 році та синтезується кількома штамми *Enterococcus faecium*. Він проявляє активність

проти *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Pediococcus* spp. та *L. monocytogenes* [20].

Наявність у геномі штаму одразу кількох генів бактеріоцинів може свідчити про його здатність ефективно конкурувати з іншими представниками мікробіоти та пригнічувати ріст потенційно патогенних бактерій. Проведений тест на визначення антагоністичної активності засвідчив здатність даного ізоляту пригнічувати ріст грампозитивних та грамнегативних бактерій. Таким чином, виявлений комплекс бактеріоцинів може бути одним із факторів, що забезпечує цю антагоністичну активність і засвідчує пробіотичний потенціал штаму *Enterococcus* sp. SB12.

Філогенетичний аналіз штаму SB12 показав спорідненість даного штаму з ентерококовими культурами, які також були виявлені як даний ізолят – в молочнокислих продуктах та зі штамми які уже використовуються в складі пробіотичних препаратів, і відповідно визнаними безпечними у використанні. Порівняльний геномний аналіз виявив подібність між штамом SB12 та потенційними пробіотичними штамми *E. faecium*, водночас підкреслюючи відмінності від патогенного штаму *E. faecium* ATCC 700221. Загальна архітектура геному SB12 більше схожа на архітектуру геному штамів, виділених з ферментованих продуктів. Водночас, геноми промислових пробіотичних штамів також хакартеризувалися подібним набором генів патогенності та вірулентності як і у SB12. На відміну від патогенного штаму, SB12 демонстрував меншу кількість мобільних генетичних елементів, а також менше генів вірулентності та стійкості до антибіотиків. Крім того, наявність кластерів генів бактеріоцинів у SB12 підкреслює його потенційну корисність у пригніченні патогенних мікроорганізмів, тим самим, посилюючи пробіотичні властивості штаму [135].

Отож, отримані у ході біоінформатичного та філогенетичного аналізу дані в комплексі з мікробіологічними дослідженнями засвідчили потенційну безпеку використання штаму SB12.

На другому етапі дослідження було проведено визначення здатності штаму *Enterococcus* sp. SB12 витримувати умови, що виникають під час потрапляння в кишково-шлунковий тракт (ШКТ) для подальшого експерименту на тваринах, а також підбір оптимальних умов для його культивування в промисловості. Щоб оцінити його стійкість при потрапленні в макроорганізм, ми використали фермент лізоцим та середовища з кислим рН, бо це є два найголовніших фактори оцінки виживання в ШКТ. Оскільки лізоцим міститься в слині в найвищій концентрації (2,2–5,9 мкг/мл) [166] і характеризується антибактеріальною дією, він руйнує клітинні стінки бактерій і таким чином є першою лінією захисту від проникнення мікробів в організм. Рівень рН чистого шлункового соку становить 2,0–3,0, що призводить до загибелі більшості мікроорганізмів, які потрапляють у шлунок [276]. Штам ентерококів SB12, використаний у цьому дослідженні, показав помірну чутливість до лізоциму при обробці ферментом протягом 10 хвилин. Однак час перебування їжі або напоїв у ротовій порожнині значно коротший. Тому ми прогнозуємо, що штам SB12 буде незначно піддаватися впливу ферменту лізоциму. Щодо виживання в кислих умовах, які моделюють стан шлунку, штам SB12 продемонстрував рівень виживання 95% при рН=3,0. Зі збільшенням кислотності виживання тестованого штаму значно знижувалося. Однак слід також враховувати, що при вживанні певних продуктів рН шлунка може досягати 4,0 залежно від їжі [7]. Таким чином, додавання штаму SB12 до раціону сприятиме його виживанню в умовах високої кислотності. Тому штам SB12 у шлунково-кишковому тракті, при використанні в харчових системах, ймовірно, зможе протистояти впливу лізоциму та кислого рН.

Термостійкість є вирішальним фактором для бактерій, що розглядаються для промислового застосування, оскільки забезпечує їх стабільність під час обробки [321]. Також важливо, щоб штам був солестійким, оскільки це свідчить про високу осмотичну стійкість та здатність до колонізації кишечника при потрапленні бактерії в організм у складі ферментованих продуктів, які часто містять у своєму складі велику кількість солі, зокрема, сири, м'ясні продукти. Одержані дані засвідчили те, що *Enterococcus* sp. SB12 здатний виживати за

температури до 50 °C та значеннях солоності 5%, що вказує на необхідність оптимізації температурних умов для обробки або пакування в умовах ймовірного промислового виробництва.

Попередньо було встановлено, що оптимальним середовищем для культивування даного штаму було середовище для молочнокислих бактерій – MRS за рахунок комплексу поживних речовин та ростових факторів. Також було досліджено вплив різного рН середовища на приріст біомаси штаму *Enterococcus* sp. SB12, щоб обрати оптимальне значення кислотності середовища для використання в промислових умовах. В результаті дослідження, найінтенсивніший ріст культури через 16 годин культивування було зафіксовано у середовищі з рН=7,0. Водночас через 24 години культивування найвищу швидкість накопичення біомаси спостерігалася при рН=9,0, тоді як при рН=6,0 вона була найнижчою. Таким чином, використання середовищ із лужним значенням рН може призвести до більшого накопичення біомаси штаму SB12.

Третім етапом даної роботи стала ідентифікація метаболічного потенціалу штаму та сполук, що забезпечують його антимікробну активність, а також визначають пробіотичний потенціал із використанням MALDI-TOF та ВЕРХ-МС аналізів.

Здатність пробіотичного штаму до біосинтезу вітамінів та амінокислот є важливою складовою його метаболічного потенціалу, оскільки ці сполуки забезпечують життєздатність штаму в середовищі та ефективну взаємодію з організмом господаря. Аналіз вітамінного складу біомаси *Enterococcus* sp. SB12 показав наявність у клітинах комплексу водорозчинних вітамінів, зокрема тіаміну, рибофлавіну-5-фосфату, нікотинової кислоти, нікотинаміду, піридоксину, кальцію пантотенату та аскорбінової кислоти. Найбільші концентрації були встановлені для вітаміну В5 (кальцію пантотенату), вітаміну В6 (піридоксину) та вітаміну В3 (нікотинової кислоти). Відомо, що багато представників молочнокислих бактерій здатні синтезувати вітаміни групи В, які можуть покращувати харчову цінність ферментованих продуктів та позитивно впливати на метаболізм організму господаря. За даними LeBlanc та співавт.

[192], продукція вітамінів групи В є однією з важливих функціональних характеристик пробіотичних штамів, що визначає їхню біотехнологічну цінність. Отримані результати вказують на наявність у *Enterococcus* sp. SB12 активних метаболічних шляхів біосинтезу вітамінів та підтверджують перспективність його використання як функціональної культури у харчових технологіях.

Дослідження амінокислотного складу продемонструвало інтенсивний метаболізм азотовмісних сполук у штаму *Enterococcus* sp. SB12. Найбільше накопичення в біомасі спостерігалось для валіну, глутаміну, цистеїну та проліну. Відомо, що підвищений внутрішньоклітинний вміст глутаміну та амінокислот з розгалуженим ланцюгом пов'язаний з активними процесами росту, синтезу протеїнів та адаптації бактерій до стресових умов. Водночас накопичення цистеїну може сприяти підвищенню антиоксидантного потенціалу клітин завдяки його участі у синтезі тіоловмісних сполук та підтриманні редокс-гомеостазу [281].

Особливу увагу привертає значне підвищення концентрації таурину в культуральному середовищі після культивування штаму. Таурин виконує важливі функції в організмі тварин, включаючи регуляцію осмотичного тиску, стабілізацію клітинних мембран та участь у антиоксидантному захисті. Незважаючи на те, що метаболізм таурину у молочнокислих бактерій залишається недостатньо вивченим, отримані результати можуть вказувати на активну трансформацію сірковмісних сполук *Enterococcus* sp. SB12, що заслуговує на подальше детальне дослідження [23].

Використання методу MALDI-TOF забезпечує високу роздільну здатність, чутливість і можливість аналізувати складні біологічні зразки такі як білки та пептиди, які характеризуються відносно високою молекулярною масою в порівнянні з іншими типами молекул, і для яких застосування ВЕРХ-МС аналізу є обмеженим і здебільшого використовується для ідентифікації сполук з невеликою молекулярною масою [78]. Як уже зазначалося, біоінформатичний аналіз геному досліджуваного штаму показав наявність кількох кластерів генів бактеріоцинів та одного кластеру синтезу вторинних метаболітів класу PKS, які

можуть визначати його антимікробну активність . Проте, у базі даних DNP після проведеного ВЕРХ-МС аналізу не було ідентифіковано сполук, що відповідають передбаченим біоінформатично PKS-продуктам. Це може бути пов'язано із наявністю в екстрактах штаму SB12 сполук невідомої природи або недостатньо охарактеризованих вторинних метаболітів, які відсутні у наявних базах даних. MALDI-TOF мас-спектрометрія виявила лише два пептидні піки, маси яких не відповідали теоретично розрахованим масам ідентифікованих бактеріоцинів. Крім того, екстракти культури, отримані після 24 та 48 год культивування, не проявляли антимікробної активності проти тест-культур патогенів. Проте, як уже було показано раніше, сам штам SB12 демонстрував інгібувальну дію щодо тест-патогенів при попередньому рості на агаризованому середовищі. Це можна пояснити тим, що ймовірно, антимікробна сполука синтезується безпосередньо під час росту бактерій, є фазозалежною, та накопичується локально у зоні колонії, тоді як у рідкому середовищі її концентрація може бути недостатньою для прояву інгібуючого ефекту. Також не виключено, що активний метаболіт є клітинозв'язаним або нестабільним у культуральному супернатанті через дію протеаз чи інактивування в процесі екстракції. Можливим є і те, що за використаних умов культивування може бути відсутня експресія генних кластерів бактеріоцинів, або для формування біологічно активної форми також є необхідними процеси посттрансляційної модифікації та процесингу пептидів.

Переконавшись в здатності ізоляту SB12 до виживання в складних умовах середовища, а також оцінивши його перспективний пробіотичний метаболізм було перейдено до четвертого етапу роботи, а саме до експерименту *in vivo*, який проводився на лабораторних мишах. Для цього експерименту *Enterococcus* sp. SB12 вводився у формі суспензії в стерильній воді. Попередньо було проведено оцінку виживання бактерій за таких умов впродовж 96-ти годин. Встановлене поступове зниження кількості життєздатних клітин *Enterococcus* sp. SB12 у питній воді впродовж 96-ти годин. Отримані дані відповідають результатам інших досліджень, у яких показано, що ентерококи та інші представники молочнокислих бактерій здатні тривалий час зберігати життєздатність у водному

середовищі, хоча з часом спостерігається поступове зниження кількості колонієутворюючих одиниць. Важливим є те, що протягом перших 24 годин зберігання концентрація життєздатних клітин залишалася достатньою для забезпечення необхідної пробіотичної дози під час експерименту *in vivo*. Подібні результати були отримані й іншими авторами, які показали, що ентерококи можуть зберігати життєздатність у питній воді протягом часу, достатнього для ефективного перорального введення лабораторним тваринам, що підтверджує перспективність такого способу доставки пробіотичних культур [115, 168].

Введення *Enterococcus* sp. SB12 впродовж 29-ти діб супроводжувалося статистично достовірним збільшенням маси тіла мишей за відсутності змін маси внутрішніх органів та вісцерального жиру. Відсутність достовірних відмінностей у масі печінки, серця, нирок і жирової тканини свідчить про те, що застосування штаму не призводило до патологічних змін або гіпертрофії органів. Поєднання збільшення маси тіла зі стабільними показниками маси внутрішніх органів може вказувати на покращення засвоєння поживних речовин або певну модифікацію метаболічних процесів під впливом пробіотичної культури. Подібні результати були отримані в роботах інших авторів, де використання пробіотичних штамів *Enterococcus* призводило до покращення ростових показників тварин без негативного впливу на морфологію органів та біохімічні показники організму [104, 280].

Нами було оцінено потенційний пробіотичний вплив даного штаму безпосередньо на макроорганізм, зокрема, на зміну складу мікробіому кишечника мишей. Кишковий мікробіом є важливий для підтримки здоров'я людини та тварин, оскільки впливає на загальну якість та тривалість життя. Цей вплив значною мірою пояснюється його вирішальною роллю в регулюванні метаболізму, підтримці імунного гомеостазу та підвищенні стійкості до вікових фізіологічних змін [35]. В результаті аналізу метагеному було встановлено, що мікробна композиція дослідних мишей, які отримували водну суспензію штаму SB12 змінюється в порівнянні з контрольною групою в бік збільшення

представників виду *Enterococcus faecium*. Це в свою чергу підтверджує здатність даного штаму виживати в умовах ШКТ та колонізувати кишківник.

Загалом, склад мікробіому кишечника мишей узгоджується з даними, що описують «базові» бактерії в кишечнику здорових лабораторних тварин, де *Firmicutes* і *Bacteroidota* зазвичай представляють найбільші фракції, а такі родини, як *Lachnospiraceae* і *Lactobacillaceae*, спостерігаються найчастіше. [322]. Зменшення чи відсутність *Desulfobacterota*, особливо представників родини *Desulfovibrionaceae* та роду *Desulfovibrio*, в експериментальній групі можна вважати позитивною зміною в мікробіоті кишечника мишей. Це пов'язано з тим, що сульфатредуючі бактерії часто вважаються факторами, що сприяють запаленню кишечника через вироблення сірководню та посилюють DSS-індукований коліт [155, 327].

У мишей колонізація *Helicobacter* spp. є поширеним явищем у лабораторних та диких колоніях і може відігравати важливу роль у підтримці гомеостазу мікробіому [367]. Зменшення або зникнення таксонів, пов'язаних з протеобактеріями, включаючи представників роду *Helicobacter*, часто інтерпретується як позитивна зміна в мікробіоті кишечника багатьох тварин і людей, оскільки збагачення протеобактеріями та *Helicobacter* spp. пов'язане з рядом шлунково-кишкових захворювань, таких як хронічний гастрит, пептична виразка та рак шлунка. До того ж, *Helicobacter pylori* є загально визнаною причиною хронічного активного гастриту і класифікується як канцероген I-го класу через зв'язок із раком шлунка та іншими важкими гастроуденальними патологіями [197].

У літературі, присвяченій мікробіому кишечника, підкреслюється, що спільноти грибів зазвичай складають меншу біомасу, є більш мінливими і сильно залежать від раціону харчування, генетики хазяїна та взаємодії між бактеріями і грибами [299, 318, 366]. У нашому дослідженні в експериментальній групі мишей спостерігалось суттєве зменшення різноманітності представників грибів у кишечнику в порівнянні з контрольною групою. У здоровому кишечнику бактерії домінують над грибами, тому зменшення грибкової складової може

вказувати на стабілізацію мікробіоти кишківника за рахунок пригнічення потенційних патогенів метаболітами кишкових бактерій або впливом пробіотичних мікроорганізмів [253]. Таким чином, введення SB12 сприяє зменшенню грибкової складової кишкової мікробіоти і може зумовлювати зміщення мікробного балансу на користь бактерій, пригнічення опортуністичних грибів та потенційну нормалізацію стану кишківника.

Загалом, дані, отримані в результаті метагеномного аналізу, свідчать про збільшення кількості представників корисної мікрофлори шлунково-кишкового тракту та зменшення кількості опортуністичних патогенів. Таким чином, було виявлено значний позитивний вплив штаму *Enterococcus* sp. SB12 на мікробіом травного тракту мишей, що підтверджує його потенціал як можливого пробіотика.

На п'ятому етапі дослідження проводилася оцінка біохімічних параметрів мишей для отримання достовірної інформації про вплив штаму SB12 на стан організму тварин.

Рівні холестерину ЛПВЩ і ЛПНЩ широко використовуються як показники ліпідного обміну та загального метаболічного здоров'я, в тому числі в дослідженнях, що оцінюють пробіотичний вплив на тваринних і людських моделях. Крім того, штами ентерококів можна вважати потенційними засобами для зниження рівнів холестеролу, ефект яких, опосередковується їхньою активністю жовчної солі гідролази (BSH), що сприяє декон'югації жовчної солі та подальшому використанню холестеролу [115]. Аналогічно, концентрація глюкози в крові відображає стан вуглеводного обміну, а загальний білок (альбумін) служить маркером білкового обміну, транспортної здатності та загальної фізіологічної стабільності організму [329]. В нашому дослідженні ці показники не мали суттєвих відмінностей між тваринами експериментальної та контрольної групи, що свідчить про відсутність негативного впливу штаму SB12.

Важливим критерієм безпеки та функціональної цінності нових пробіотичних штамів є їхня взаємодія з оксидантно-антиоксидантною системою організму господаря та здатність протидіяти оксидативному стресу.

Гідроперекиси ліпідів (ГПЛ) є первинними молекулярними продуктами пероксидації, поява яких свідчить про початкові етапи вільнорадикальної деструкції ліпідного бішару клітинних мембран. Оскільки надмірний рівень ГПЛ може призводити до фрагментації ліпідів і порушення бар'єрної функції мембран, стабільність цього показника є важливим індикатором збереження клітинного гомеостазу за дії екзогенних чинників. У нашій роботі встановлено, що вміст ГПЛ у тканинах печінки та кишківника тварин дослідної групи мав чітку тенденцію до зниження порівняно з контрольними значеннями (відповідно 1,345 проти 1,507 нмоль/мг білка та 0,989 проти 1,112 нмоль/мг білка). Така динаміка вказує на зміцнення локальних систем захисту, які ефективно нівелюють ініціацію вільнорадикальних ланцюгів безпосередньо в зонах первинного контакту та активного метаболізму пробіотика. Водночас на тлі тканинної стабілізації спостерігалось помірне підвищення рівня ГПЛ у сироватці крові (4,290 проти 3,532 нмоль/мг у контролі). Зафіксовану динаміку доцільно розглядати як прояв адаптивної метаболічної активації або «ефект мобілізації» антиоксидантних ресурсів організму у відповідь на введення екзогенного біологічного чинника. Це зростання не супроводжувалося накопиченням вторинних токсичних продуктів (ТБК), що підтверджує контрольованість процесу та відсутність розвитку системного окисного стресу. Зменшення концентрації первинних продуктів ПОЛ у паренхімі печінки та епітелії кишківника свідчить про антиоксидантний потенціал штаму *Enterococcus* sp. SB12.

Паралельно з ліпідами, значної деструкції під дією оксидантів зазнають протеїни. Окисна модифікація білків є раннім і чутливим маркером ушкодження тканин, що часто передує клінічним проявам інтоксикації. Моніторинг рівня карбонільних груп білків дає змогу оцінити «метаболічний комфорт» тварин за умов тривалого перорального навантаження пробіотиком для підтвердження його безпечності як кормової добавки чи фармакологічного засобу [104]. У нашій роботі детекцію рівня ОМБ проводили при трьох довжинах хвиль для диференціації стадій та характеру протеодеструкції: при  $\lambda = 274$  нм реєстрували

рівень ранніх продуктів окиснення (модифікованих амінокислотних залишків); при  $\lambda = 370$  нм — альдегідо- та кетоніальні нейтрального характеру (ОМБ<sub>370</sub>); при  $\lambda = 430$  нм — карбонільні похідні основного характеру (ОМБ<sub>430</sub>), що свідчать про глибоку деструкцію білків. Отримані дані показали, що введення пробіотичного штаму *Enterococcus* sp. SB12 не призводило до статистично вірогідної інтенсифікації процесів окиснення білків порівняно з контрольною групою ( $P > 0,05$ ). У тканині печінки показники всіх фракцій карбонільних похідних залишалися на рівні значень контрольних тварин.

Враховуючи, що кишківник є зоною безпосереднього контакту при пробіотичній корекції, виявлена нами позитивна тенденція до зниження вмісту кетоніальних на 25% (0,03 проти 0,04 мкмоль/мг білка) може вказувати на локальний цитопротекторний ефект штаму SB12 та його здатність посилювати антиоксидантний ресурс тканин, запобігаючи інтенсивній окисній деградації протеїнів. Враховуючи важливу роль печінки у процесах детоксикації та чутливість її протеому до ксеногенного навантаження, стабільність показників ОМБ вказує на збереження структурно-функціональної цілісності гепатоцитів та відсутність прооксидантного впливу штаму SB12.

Одним з основних маркерів окисного стресу також є рівень малонового діальдегіду, який підвищується у відповідь на збільшення АФК. Крім того, він є мутагеном і має виражену цитотоксичність, що призводить до змін у структурі клітинної мембрани і потенційно може спричинити її руйнування [80]. У нашому дослідженні аналіз вмісту ТБК-активних продуктів у сироватці крові, а також у гомогенатах печінки та нирок не виявив статистично значущих відмінностей між дослідною та контрольною групами тварин. У сироватці крові стабільність рівня ТБК-активних продуктів також вказує на відсутність системної прооксидантної відповіді організму на введення штаму *Enterococcus* sp. SB12. У тканинах печінки та нирок, які є основними органами метаболізму та екскреції, відсутність накопичення продуктів ПОЛ підтверджує, що штам не ініціює локальне ураження паренхіматозних клітин.

У науковій літературі підкреслюється, що пробіотичні ентерококи часто діють як модулятори антиоксидантних систем, підтримуючи активність ферментів першої лінії захисту [259]. Внутрішньоклітинна система антиоксидантного захисту, яка включає ферменти супероксиддисмутазу, каталазу та глутатіонпероксидазу, відіграє центральну роль у захисті тканин та органів від шкідливого впливу активних форм кисню та їх побічних продуктів. Активність цих ферментів, зокрема каталази, широко використовується як показник антирадикальної захисної здатності організму, оскільки каталаза ефективно розкладає перекис водню на воду та молекулярний кисень, тим самим, запобігаючи окислювальному пошкодженню клітинних компонентів [158]. Водночас знижена активність каталази може відігравати важливу роль в етіології низки захворювань, таких як хвороба Паркінсона [256]. Каталаза широко поширена в тканинах ссавців, але особливо багато її в печінці, що відображає високий окислювальний стрес, пов'язаний з метаболічними процесами в цьому органі. Завдяки високій каталітичній ефективності та відносній стабільності, активність каталази оцінюється як надійний маркер антиоксидантного захисту та окисно-відновного гомеостазу, особливо в дослідженнях, що оцінюють оксидативний стрес у тканинах печінки [127]. Вивчення активності каталази у поєднанні з моніторингом продуктів пероксидації дозволяє сформувати цілісну картину адаптаційної відповіді організму на колонізацію кишечника новим мікроорганізмом [88].

Встановлено, що застосування штаму *Enterococcus* sp. SB12 не спричинило вірогідних змін активності досліджуваного ензиму у мишей порівняно з контролем і зберігалася на рівні значень контрольної групи. Виявлена тенденція до незначного зростання даного показника може вказувати на формування стабільного антиоксидантного резерву, проте відсутність статистичної достовірності ( $P > 0,05$ ) дозволяє трактувати ці результати насамперед як збереження редокс-гомеостазу та функціональної цілісності системи детоксикації АФК. Згідно з оглядовими даними [159], здатність підтримувати метаболічну рівновагу господаря є критичним фактором безпечного

застосування ентерококів. Оскільки каталаза відіграє вирішальну роль у детоксикації АФК, її незмінний рівень у нашому експерименті свідчить про відсутність потреби в компенсаторній відповіді організму на окисний стрес, що зазвичай спостерігається при патогенному чи токсичному навантаженні.

Такий ефект може бути зумовлений власною антиоксидантною дією досліджуваного ізоляту. Згідно з літературними даними, представники роду *Enterococcus* та інші молочнокислі бактерії виробляють численні біоактивні метаболіти, зокрема фенольні сполуки та кислі екзополісахариди (EPS), які мають здатність безпосередньо поглинати гідроксильні радикали [160, 359]. Подібні протекторні властивості щодо нівелювання проявів оксидативного пошкодження були описані також для штамів *L. brevis* BJ20 та *L. plantarum* 7FM10 [79]. Отже, зафіксована нами стабільність біохімічних показників вказує на те, що введення *Enterococcus* sp. SB12 не тільки не виснажує внутрішні ресурси організму, а й, ймовірно, створює додатковий захисний бар'єр завдяки своїм пробіотичним властивостям [195, 289].

Результати нашого дослідження щодо збереження редокс-рівноваги також корелюють із даними для ряду інших безпечних ентерококів [30], що слугує прямим доказом метаболічної інертності та токсикологічної безпеки штаму SB12.

Підсумовуючи отримані результати, можна констатувати, що повногеномне секвенування в поєднанні з біоінформатичним аналізом виявило у штамі *Enterococcus* sp. SB12 низку геномних особливостей, які відповідають критеріям перспективного пробіотичного мікроорганізму, зокрема відсутність функціональних генів токсинів та трансферабельних детермінант антибіотикорезистентності. Крім того, завдяки сприятливим технологічним характеристикам, таким як активний ріст, здатність до підкислення середовища та стабільність під час технологічної обробки, даний штам був раніше визначений як перспективний кандидат для використання у виробництві ферментованих молочних продуктів [249].

Проведені дослідження первинного та вторинного метаболізму показали здатність *Enterococcus* sp. SB12 синтезувати та накопичувати біологічно важливі вітаміни й амінокислоти, що може додатково підсилювати його функціональні властивості та потенційний позитивний вплив на організм господаря. Встановлено, що штам зберігав достатню життєздатність у питній воді, успішно персистував у шлунково-кишковому тракті експериментальних тварин та спричиняв зміни у складі бактеріальних і грибних угруповань кишечника, які загалом можна розглядати як сприятливі з точки зору підтримання мікробіологічного гомеостазу.

Водночас тривале введення *Enterococcus* sp. SB12 супроводжувалося збільшенням маси тіла мишей без негативного впливу на біохімічні показники крові, маркери оксидативного стресу, активність антиоксидантної системи та морфофункціональний стан внутрішніх органів. Сукупність отриманих геномних, метаболічних, мікробіологічних та фізіологічних даних свідчить про високий біотехнологічний потенціал *Enterococcus* sp. SB12 і підтверджує доцільність його подальшого вивчення як перспективного пробіотичного штаму та компонента функціональних харчових продуктів.

## ВИСНОВКИ

На основі комплексного підходу охарактеризовано пробіотичний потенціал нового штаму *Enterococcus* sp. SB12, виділеного з традиційної карпатської бринзи. Проведені геномні, мікробіологічні, біохімічні та метагеномні дослідження дозволили встановити відсутність ключових генетичних маркерів вірулентності та набутої антибіотикорезистентності, підтвердити здатність штаму виживати у шлунково-кишковому тракті, модулювати склад кишкового мікробіому та не спричиняти негативних змін фізіолого-біохімічного стану експериментальних тварин. Додатково встановлено здатність штаму до синтезу біологічно активних метаболітів, зокрема бактеріоцинів, вітамінів та амінокислот, що визначає його перспективність для створення пробіотичних препаратів та функціональних харчових продуктів.

1. На основі повногеномного секвенування встановлено, що геном штаму *Enterococcus* sp. SB12 має загальний розмір 2,69 Мб., складається з хромосоми та двох плазмід, містить інтактні профагові ділянки та мобільні генетичні елементи. Порівняльний геномний аналіз підтвердив приналежність штаму до кластера ентерококів, асоційованих із ферментованими харчовими продуктами та пробіотичними культурами, а також показав відсутність плазмідних детермінант вірулентності та трансмісивної резистентності до критично важливих антибіотиків, зокрема генів *vanA* та *vanB*.
2. Визначено генетичний потенціал штаму до синтезу широкого спектра біологічно активних метаболітів. У геномі ідентифіковано кластери генів бактеріоцинів різних класів (ентеролізін А, ентероцини А, Р, L50a та SE-K4), кластер полікетидсинтази III типу (Type III PKS), а також локуси метаболізму галової кислоти, пірувату та аргініндеїміназного шляху. Незважаючи на наявність окремих хромосомних генів стійкості (*AAC(6')-Ii*, *efrA*, *eatAv*, *vanY*),

результати фенотипового тестування підтвердили чутливість штаму до терапевтично важливих антибактеріальних препаратів.

3. Експериментально підтверджено виражений антагоністичний потенціал штаму *Enterococcus* sp. SB12 щодо грампозитивних (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium smegmatis*) та грамнегативних (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) тест-культур. Методом MALDI-TOF мас-спектрометрії у безклітинному супернатанті виявлено два специфічні пептидні піки з молекулярною масою 1775 та 1883 Да, які можуть бути пов'язані з антимікробною активністю штаму.
4. Доведено високий адаптаційний потенціал та технологічну стійкість штаму *Enterococcus* sp. SB12 до дії несприятливих фізико-хімічних чинників *in vitro*. Штам зберігав життєздатність за умов термічного стресу (до 60 °C), високої концентрації солі (5% NaCl), присутності лізоциму до 20 мг/мл та за низьких значень рН (рН 2,0), що свідчить про його потенційну здатність долати бар'єри шлунково-кишкового тракту.
5. На основі метагеномного аналізу встановлено здатність штаму *Enterococcus* sp. SB12 виживати та персистувати у шлунково-кишковому тракті мишей. Пероральне введення культури супроводжувалося змінами у структурі кишкового мікробіому, які характеризувалися збільшенням чисельності окремих представників коменсальної мікробіоти та зменшенням кількості деяких умовно-патогенних і потенційно прозапальних мікроорганізмів, зокрема представників родини *Desulfovibrionaceae* та роду *Helicobacter*.
6. Встановлено здатність *Enterococcus* sp. SB12 до синтезу та накопичення біологічно важливих вітамінів групи В (В1, В2, В3, В5, В6) та аскорбінової кислоти, а також до активного метаболізму амінокислот із накопиченням у біомасі валіну, глутаміну, цистеїну та проліну. Отримані результати свідчать про високий метаболічний

потенціал штаму та його перспективність як продуцента функціонально цінних сполук.

7. Комплексною оцінкою фізіолого-біохімічного статусу лабораторних тварин *in vivo* встановлено відсутність негативного впливу штаму *Enterococcus* sp. SB12 за умов проведеного експерименту. Показники білкового, вуглеводного та ліпідного обміну (загальний білок, глюкоза, холестерин ЛПВЩ та ЛПНЩ), інтенсивність процесів пероксидного окиснення ліпідів та білків (вміст ТБК-активних продуктів і маркерів окисної модифікації білків), а також активність каталази не відрізнялися від контрольних значень ( $p > 0,05$ ). Водночас введення штаму супроводжувалося збільшенням маси тіла тварин без змін маси внутрішніх органів, що свідчить про сприятливий профіль безпечності та відсутність ознак токсичної дії.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Ahmed, M. O., & Baptiste, K. E. (2018). Vancomycin-resistant enterococci: a review of antimicrobial resistance mechanisms and perspectives of human and animal health. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)*, *24(5)*, 590–606. <https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0147>
2. Ahn, Hyunwoo & Lee, Geonhak & Lee, Woorin & Kim, Mingyu & Lee, Kwang-Geun. (2023). Evaluation of probiotic and anti-inflammatory properties of bacteriocinogenic *Pediococcus acidilactici* HW01 and *Leuconostoc citreum* HW02 from malted barley. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*. 10.1186/s40538-023-00425-4.
3. Akagawa M. (2021). Protein carbonylation: molecular mechanisms, biological implications, and analytical approaches. *Free radical research*, *55(4)*, 307–320. <https://doi.org/10.1080/10715762.2020.1851027>
4. Albano, C., Morandi, S., Silvetti, T., Casiraghi, M. C., Manini, F., & Brasca, M. (2018). Lactic acid bacteria with cholesterol-lowering properties for dairy applications: in vitro and in situ activity. *Journal of dairy science*, *101(12)*, 10807–10818. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15096>
5. Alduhaidhawi, A. H. M., AlHuchaimi, S. N., Al-Mayah, T. A., Al-Ouqaili, M. T. S., Alkafaas, S. S., Muthupandian, S., & Saki, M. (2022). Prevalence of CRISPR-Cas systems and their possible association with antibiotic resistance in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* collected from hospital wastewater. *Infection and drug resistance*, *15*, 1143–1154. <https://doi.org/10.2147/IDR.S358248>
6. Almeida-Santos, A. C., Novais, C., Peixe, L., & Freitas, A. R. (2021). *Enterococcus* spp. as a producer and target of bacteriocins: a double-edged sword in the antimicrobial resistance crisis context. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, *10(10)*, 1215. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10101215>
7. Amaral, D. M. F., Silva, L. F., Casarotti, S. N., Nascimento, L. C. S., & Penna, A. L. B. (2017). *Enterococcus faecium* and *Enterococcus durans* isolated from cheese: survival in the presence of medications under simulated gastrointestinal

- conditions and adhesion properties. *Journal of dairy science*, *100*(2), 933–949.  
<https://doi.org/10.3168/jds.2016-11513>
8. Amidi-Fazli, N., & Hanifian, S. (2022). Biodiversity, antibiotic resistance and virulence traits of *Enterococcus* species in artisanal dairy products. *International Dairy Journal*, *129*, 105287.
  9. Andrewes, F.W., & Horder, T.J. (1906). The study of the streptococci pathogenic in man. *The Lancet*, *168*, 1621-1622.
  10. Andrighetto, C., Knijff, E., Lombardi, A., Torriani, S., Vancanneyt, M., Kersters, K., Swings, J., & Dellaglio, F. (2001). Phenotypic and genetic diversity of enterococci isolated from Italian cheeses. *The Journal of dairy research*, *68*(2), 303–316. <https://doi.org/10.1017/s0022029901004800>
  11. Anjana, & Tiwari, S. K. (2022). Bacteriocin-Producing Probiotic Lactic Acid Bacteria in Controlling Dysbiosis of the Gut Microbiota. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, *12*, 851140. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.851140>
  12. Anjum, M., Laitila, A., Ouwehand, A. C., & Forssten, S. D. (2022). Current Perspectives on Gastrointestinal Models to Assess Probiotic-Pathogen Interactions. *Frontiers in microbiology*, *13*, 831455. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.831455>
  13. Archambaud, C., Nunez, N., da Silva, R. A. G., Kline, K. A., & Serror, P. (2024). *Enterococcus faecalis*: an overlooked cell invader. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, *88*(3), e0006924. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00069-24>
  14. Arias, C. A., & Murray, B. E. (2012). The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nature reviews. Microbiology*, *10*(4), 266–278. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2761>
  15. Arshadi, M., Mahmoudi, M., Motahar, M. S., Soltani, S., & Pourmand, M. R. (2018). Virulence determinants and antimicrobial resistance patterns of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated from different sources in southwest Iran. *Iranian journal of public health*, *47*(2), 264–272.

16. Aspri, Maria & O'Connor, Paula & Field, Des & Cotter, Paul & Ross, Reynolds Paul & Hill, Colin & Papademas, Photis. (2017). Application of bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* isolated from donkey milk, in the bio-control of *Listeria monocytogenes* in fresh whey cheese. *International Dairy Journal*, 73. 10.1016/j.idairyj.2017.04.008.
17. Aswal, M., Singhal, N., & Kumar, M. (2023). Comprehensive genomic analysis of hypocholesterolemic probiotic *Enterococcus faecium* LR13 reveals unique proteins involved in cholesterol-assimilation. *Frontiers in nutrition*, 10, 1082566. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1082566>
18. Avci, Damla & Gillarova, Simona & Henke, Svatopluk & Bubník, Zdeněk & Sluková, Marcela. (2025). Probiotic lactic acid bacteria in biotechnology and the food industry: A review. *Czech Journal of Food Sciences*, 43, 75-89. 10.17221/17/2025-CJFS.
19. Avila, M., Garde, S., Medina, M., & Nuñez, M. (2005). Effect of milk inoculation with bacteriocin-producing lactic acid bacteria on a *Lactobacillus helveticus* adjunct cheese culture. *Journal of food protection*, 68(5), 1026–1033. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-68.5.1026>
20. Aymerich, T., Holo, H., Håvarstein, L. S., Hugas, M., Garriga, M., & Nes, I. F. (1996). Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Applied and environmental microbiology*, 62(5), 1676–1682. <https://doi.org/10.1128/aem.62.5.1676-1682.1996>
21. Azzaz, Hossam & Kholif, Ahmed & Murad, Hussein & Vargas-Bello-Pérez, Einar. (2022). A newly developed strain of *Enterococcus faecium* isolated from fresh dairy products to be used as a probiotic in lactating Holstein cows. *Frontiers in Veterinary Science*, 9. 10.3389/fvets.2022.989606.
22. Baccouri, O., Boukerb, A. M., Farhat, L. B., Zébré, A., Zimmermann, K., Domann, E., Cambronel, M., Barreau, M., Maillot, O., Rincé, I., Muller, C., Marzouki, M. N., Feuilloley, M., Abidi, F., & Connil, N. (2019). Probiotic potential and safety evaluation of *Enterococcus faecalis* OB14 and OB15,

- isolated from traditional tunisian testouri cheese and rigouta, using physiological and genomic analysis. *Frontiers in microbiology*, 10, 881. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00881>
23. Bae, M., Ahmed, K., & Yim, J. E. (2022). Beneficial Effects of Taurine on Metabolic Parameters in Animals and Humans. *Journal of obesity & metabolic syndrome*, 31(2), 134–146. <https://doi.org/10.7570/jomes21088>
24. Baptista, D. P., & Gigante, M. L. (2021). Bioactive peptides in ripened cheeses: release during technological processes and resistance to the gastrointestinal tract. *Journal of the science of food and agriculture*, 101(10), 4010–4017. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11143>
25. Barbieri, F., Montanari, C., Gardini, F., & Tabanelli, G. (2019). Biogenic Amine Production by Lactic Acid Bacteria: A Review. *Foods (Basel, Switzerland)*, 8(1), 17. <https://doi.org/10.3390/foods8010017>
26. Barlow, Susan & Chesson, Andrew & Collins, John & Dybing, Erik & Flynn, Albert. (2007). Introduction of a qualified presumption of safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. *EFSA J.* 587.
27. Bastos, M. do C., Coelho, M. L., & Santos, O. C. (2015). Resistance to bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *Microbiology (Reading, England)*, 161(Pt 4), 683–700. <https://doi.org/10.1099/mic.0.082289-0>
28. Baureder, M., Reimann, R., & Hederstedt, L. (2012). Contribution of catalase to hydrogen peroxide resistance in *Enterococcus faecalis*. *FEMS microbiology letters*, 331(2), 160–164. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02567.x>
29. Beavis, R. C., & Chait, B. T. (1996). Matrix-assisted laser desorption ionization mass-spectrometry of proteins. *Methods in enzymology*, 270, 519–551. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(96\)70024-1](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(96)70024-1)
30. Ben Braïek, O., & Smaoui, S. (2019). Enterococci: between emerging pathogens and potential probiotics. *BioMed research international*, 2019, 5938210. <https://doi.org/10.1155/2019/5938210>

31. Ben Lagha, A., Haas, B., Gottschalk, M., & Grenier, D. (2017). Antimicrobial potential of bacteriocins in poultry and swine production. *Veterinary research*, *48*(1), 22. <https://doi.org/10.1186/s13567-017-0425-6>
32. Ben Said, L., Klibi, N., Dziri, R., Borgo, F., Boudabous, A., Ben Slama, K., & Torres, C. (2016). Prevalence, antimicrobial resistance and genetic lineages of *Enterococcus* spp. from vegetable food, soil and irrigation water in farm environments in Tunisia. *Journal of the science of food and agriculture*, *96*(5), 1627–1633. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7264>
33. Bermúdez-Humarán, L. G., Chassaing, B., & Langella, P. (2024). Exploring the interaction and impact of probiotic and commensal bacteria on vitamins, minerals and short chain fatty acids metabolism. *Microbial cell factories*, *23*(1), 172. <https://doi.org/10.1186/s12934-024-02449-3>
34. Berscheid, A., Straetener, J., Schilling, N. A., Ruppelt, D., Konnerth, M. C., Schitteck, B., Krismer, B., Peschel, A., Steinem, C., Grond, S., & Brötz-Oesterhelt, H. (2024). The microbiome-derived antibacterial lugdunin acts as a cation ionophore in synergy with host peptides. *mBio*, *15*(9), e0057824. <https://doi.org/10.1128/mbio.00578-24>
35. Biada, I., Santacreu, M. A., Blasco, A., Pena, R. N., & Ibáñez-Escriche, N. (2025). Gut microbiota variations over the lifespan and longevity in rabbit's maternal lines. *Scientific reports*, *15*(1), 17874. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-01729-1>
36. Billroth, T. (1874). Untersuchungen über die Vegetationsformen von *Coccobacteria septica* und der Antheil, welchen sie an der Entstehung und Verbreitung der accidentellen Wundkrankheiten haben. Berlin: G. Reimer.
37. Blin, K., Shaw, S., Augustijn, H. E., Reitz, Z. L., Biermann, F., Alanjary, M., Fetter, A., Terlouw, B. R., Metcalf, W. W., Helfrich, E. J. N., van Wezel, G. P., Medema, M. H., & Weber, T. (2023). antiSMASH 7.0: new and improved predictions for detection, regulation, chemical structures and visualisation. *Nucleic acids research*, *51*(W1), W46–W50. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad344>

38. Bonacina, J., Suárez, N., Hormigo, R., Fadda, S., Lechner, M., & Saavedra, L. (2017). A genomic view of food-related and probiotic *Enterococcus* strains. *DNA research: an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes*, *24*(1), 11–24. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsw043>
39. Bountra, K., Hagelueken, G., Choudhury, H. G., Corradi, V., El Omari, K., Wagner, A., Mathavan, I., Zirah, S., Yuan Wahlgren, W., Tieleman, D. P., Schiemann, O., Rebuffat, S., & Beis, K. (2017). Structural basis for antibacterial peptide self-immunity by the bacterial ABC transporter McjD. *The EMBO journal*, *36*(20), 3062–3079. <https://doi.org/10.15252/emboj.201797278>
40. Bouymajane, A., Rhazi Filali, F., Oulghazi, S., Ed-Dra, A., Benhallam, F., El Allaoui, A., Anissi, J., Sendide, K., Ouhmidou, B., & Moumni, M. (2018). Occurrence, molecular and antimicrobial resistance of *Enterococcus* spp. isolated from raw cow's milk trade by street trading in Meknes city, Morocco. *Germs*, *8*(2), 77–84. <https://doi.org/10.18683/germs.2018.1134>
41. Bover-Cid, S., & Holzapfel, W. H. (1999). Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International journal of food microbiology*, *53*(1), 33–41. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(99\)00152-x](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(99)00152-x)
42. Breuer, R. J., Hirt, H., & Dunny, G. M. (2018). Mechanistic Features of the Enterococcal pCF10 Sex Pheromone Response and the Biology of *Enterococcus faecalis* in Its Natural Habitat. *Journal of bacteriology*, *200*(14), e00733-17. <https://doi.org/10.1128/JB.00733-17>
43. Brown, J., Pirrung, M., & McCue, L. A. (2017). FQC Dashboard: integrates FastQC results into a web-based, interactive, and extensible FASTQ quality control tool. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *33*(19), 3137–3139. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx373>
44. Buckingham, J. (1993). Dictionary of Natural Products. CRC Press, London
45. Byappanahalli, M. N., Nevers, M. B., Korajkic, A., Staley, Z. R., & Harwood, V. J. (2012). *Enterococci* in the environment. *Microbiology and molecular biology reviews*: *MMBR*, *76*(4), 685–706. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00023-12>

46. Câmara, S. P., Dapkevicius, A., Riquelme, C., Elias, R. B., Silva, C., Malcata, F. X., & Dapkevicius, M. (2019). Potential of lactic acid bacteria from Pico cheese for starter culture development. *Food science and technology international = Ciencia y tecnologia de los alimentos internacional*, 25(4), 303–317. <https://doi.org/10.1177/1082013218823129>
47. Câmara, Sandra & Dapkevicius, Airidas & Silva, Célia & Malcata, Francisco & Dapkevicius, Maria de Lurdes. (2020). Artisanal Pico cheese as reservoir of *Enterococcus* species possessing virulence and antibiotic resistance properties: implications for food safety. *Food Biotechnology*, 34, 25-41. 10.1080/08905436.2019.1710844.
48. Canzek Majhenic, A., Rogelj, I., & Perko, B. (2005). *Enterococci* from Tolminc cheese: population structure, antibiotic susceptibility and incidence of virulence determinants. *International journal of food microbiology*, 102(2), 239–244. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.12.021>
49. Cariolato, Diego & Andrighetto, Christian & Lombardi, Angiolella. (2008). Occurrence of virulence factors and antibiotic resistance in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* collected from dairy and human samples in North Italy. *Food Control*, 19, 886-892. 10.1016/j.foodcont.2007.08.019.
50. Casey, Michael & Häni, Jean & Gruskovnjak, Josef & Schaeren, Walter & Wechsler, Daniel. (2006). Characterisation of the non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) of Gruyère PDO cheese. *Lait*, 86, 407-414. 10.1051/lait:2006020.
51. Castro, J. M., Tornadijo, M. E., Fresno, J. M., & Sandoval, H. (2015). Biocheese: a food probiotic carrier. *BioMed research international*, 2015, 723056. <https://doi.org/10.1155/2015/723056>
52. Cebrián, R., Baños, A., Valdivia, E., Pérez-Pulido, R., Martínez-Bueno, M., & Maqueda, M. (2012). Characterization of functional, safety, and probiotic properties of *Enterococcus faecalis* UGRA10, a new AS-48-producer strain. *Food microbiology*, 30(1), 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.12.002>
53. Centeno, J. A., Lorenzo, J. M., & Carballo, J. (2022). Effects of autochthonous *Kluyveromyces lactis* and commercial *Enterococcus faecium* adjunct cultures

- on the volatile profile and the sensory characteristics of short-ripened acid-curd Cebreiro cheese. *Food microbiology*, *108*, 104101. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104101>
54. Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A., & García-Solache, M. (2020). Ready-to-eat dairy products as a source of multidrug-resistant *Enterococcus* strains: Phenotypic and genotypic characteristics. *Journal of dairy science*, *103*(5), 4068–4077. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17395>
55. Chajęcka-Wierzchowska, Wioleta & Zadernowska, Anna & Łaniewska-Trokenheim, Łucja. (2016). Virulence factors of *Enterococcus* spp. presented in food. *LWT - Food Science and Technology*, *75*. [10.1016/j.lwt.2016.10.026](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.10.026).
56. Channaiah, L.H.; Subramanyam, B.; Zurek, L. (2018). Molecular characterization of antibiotic resistant and potentially virulent enterococci isolated from swine farms and feed mills. *J. Stored Prod. Res*, *77*, 189–196.
57. Chen, X., Su, S., Yan, Y., Yin, L., & Liu, L. (2023). Anti-*Pseudomonas aeruginosa* activity of natural antimicrobial peptides when used alone or in combination with antibiotics. *Frontiers in microbiology*, *14*, 1239540. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1239540>
58. Chikindas, M. L., Weeks, R., Drider, D., Chistyakov, V. A., & Dicks, L. M. (2018). Functions and emerging applications of bacteriocins. *Current opinion in biotechnology*, *49*, 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.07.011>
59. Ch'ng, J. H., Chong, K. K. L., Lam, L. N., Wong, J. J., & Kline, K. A. (2019). Biofilm-associated infection by enterococci. *Nature reviews. Microbiology*, *17*(2), 82–94. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0107-z>
60. Cintas, L. M., Casaus, P., Håvarstein, L. S., Hernández, P. E., & Nes, I. F. (1997). Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Applied and environmental microbiology*, *63*(11), 4321–4330. <https://doi.org/10.1128/aem.63.11.4321-4330.1997>
61. Cintas, L. M., Casaus, P., Holo, H., Hernandez, P. E., Nes, I. F., & Håvarstein, L. S. (1998). Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from

- Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *Journal of bacteriology*, 180(8), 1988–1994. <https://doi.org/10.1128/JB.180.8.1988-1994.1998>
62. Claesen, J., & Bibb, M. (2010). Genome mining and genetic analysis of cypemycin biosynthesis reveal an unusual class of posttranslationally modified peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(37), 16297–16302. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008608107>
63. Cocolin, L., Foschino, R., Comi, G., & Grazia Fortina, M. (2007). Description of the bacteriocins produced by two strains of *Enterococcus faecium* isolated from Italian goat milk. *Food microbiology*, 24(7-8), 752–758. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.03.001>
64. Cogan, Timothy. (2004). Factors that Affect the Quality of Cheese. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, 1. 10.1016/S1874-558X(04)80084-8.
65. Collins, F. W. J., Mesa-Pereira, B., O'Connor, P. M., Rea, M. C., Hill, C., & Ross, R. P. (2018). Reincarnation of Bacteriocins From the *Lactobacillus* Pangenomic Graveyard. *Frontiers in microbiology*, 9, 1298. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01298>.
66. Collins, M. & Jones, D. & Farrow, J. & Kilpper-Balz, R. & Schleifer, Karl. (1986). *Enterococcus avium* nom. rev., comb. nov.; *E. casseliflavus* nom. rev., comb. nov.; *E. durans* nom. rev., comb. nov.; *E. gallinarum* comb. nov.; and *E. malodoratus* sp. nov.. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 36, 361-361. 10.1099/00207713-36-2-361
67. Collins, M. D., Facklam, R. R., Farrow, J. A., & Williamson, R. (1989). *Enterococcus raffinosus* sp. nov., *Enterococcus solitarius* sp. nov. and *Enterococcus pseudoavium* sp. nov. *FEMS microbiology letters*, 57(3), 283–288. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(89\)90315-7](https://doi.org/10.1016/0378-1097(89)90315-7)
68. Collins, M. D., Rodrigues, U. M., Pigott, N. E., & Facklam, R. R. (1991). *Enterococcus dispar* sp. nov. a new *Enterococcus* species from human sources. *Letters in applied microbiology*, 12(3), 95–98. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.1991.tb00514.x>

69. Collins, M.D., Farrow, J.A., & Jones, D. (1986). *Enterococcus mundtii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 36, 8-12.
70. Corr, S. C., Li, Y., Riedel, C. U., O'Toole, P. W., Hill, C., & Gahan, C. G. (2007). Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(18), 7617–7621. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700440104>
71. Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature reviews. Microbiology*, 3(10), 777–788. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1273>
72. Cotter, P. D., Ross, R. P., & Hill, C. (2013). Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics?. *Nature reviews. Microbiology*, 11(2), 95–105. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2937>
73. Couvin, D., Bernheim, A., Toffano-Nioche, C., Touchon, M., Michalik, J., Néron, B., Rocha, E. P. C., Vergnaud, G., Gautheret, D., & Pourcel, C. (2018). CRISPRCasFinder, an update of CRISRFinder, includes a portable version, enhanced performance and integrates search for Cas proteins. *Nucleic acids research*, 46(W1), W246–W251. <https://doi.org/10.1093/nar/gky425>
74. Cui, P., Feng, L., Zhang, L., He, J., An, T., Fu, X., Li, C., Zhao, X., Zhai, Y., Li, H., Yan, W., Li, H., Luo, X., Lei, C., Wang, H., & Yang, X. (2020). Antimicrobial resistance, virulence genes, and biofilm formation capacity among *Enterococcus* species from yaks in Aba Tibetan Autonomous Prefecture, China. *Frontiers in microbiology*, 11, 1250. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01250>
75. Dagdemir, Elif & Ozdemir, Salih. (2008). Technological characterization of the natural lactic acid bacteria of artisanal Turkish White Pickled cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 61, 133 - 140. 10.1111/j.1471-0307.2008.00394.x.
76. Dapkevicius, M. L. E., Sgardioli, B., Câmara, S. P. A., Poeta, P., & Malcata, F. X. (2021). Current trends of *Enterococci* in dairy products: a comprehensive

- review of their multiple roles. *Foods (Basel, Switzerland)*, *10(4)*, 821. <https://doi.org/10.3390/foods10040821>
77. Darbandi, A., Asadi, A., Mahdizade Ari, M., Ohadi, E., Talebi, M., Halaj Zadeh, M., Darb Emamie, A., Ghanavati, R., & Kakanj, M. (2022). Bacteriocins: Properties and potential use as antimicrobials. *Journal of clinical laboratory analysis*, *36(1)*, e24093. <https://doi.org/10.1002/jcla.24093>
78. Darie-Ion, L., Whitham, D., Jayathirtha, M., Rai, Y., Neagu, A. N., Darie, C. C., & Petre, B. A. (2022). Applications of MALDI-MS/MS-Based Proteomics in Biomedical Research. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *27(19)*, 6196. <https://doi.org/10.3390/molecules27196196>
79. Das, Deeplina & Goyal, Arun. (2015). Antioxidant activity and  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) producing ability of probiotic *Lactobacillus plantarum* DM5 isolated from Marcha of Sikkim. *LWT - Food Science and Technology*, *61*. [10.1016/j.lwt.2014.11.013](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.11.013).
80. Dash, U. C., Bhol, N. K., Swain, S. K., Samal, R. R., Nayak, P. K., Raina, V., Panda, S. K., Kerry, R. G., Duttaroy, A. K., & Jena, A. B. (2025). Oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of neurological disorders: Mechanisms and implications. *Acta pharmaceutica Sinica. B*, *15(1)*, 15–34. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2024.10.004>
81. De Pasquale, I., Di Cagno, R., Buchin, S., De Angelis, M., & Gobbetti, M. (2019). Use of autochthonous mesophilic lactic acid bacteria as starter cultures for making Pecorino Crotonese cheese: Effect on compositional, microbiological and biochemical attributes. *Food research international (Ottawa, Ont.)*, *116*, 1344–1356. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.024>
82. De Vos, P. (2009). Bergey's manual of systematic bacteriology. Volume three, The firmicutes (2nd ed.). *Springer*. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-68489-5>
83. Del Toro-Barbosa, M., Hurtado-Romero, A., Garcia-Amezquita, L. E., & García-Cayuela, T. (2020). Psychobiotics: mechanisms of action, evaluation methods and effectiveness in applications with food products. *Nutrients*, *12(12)*, 3896. <https://doi.org/10.3390/nu12123896>

84. Demasi, M., Augusto, O., Bechara, E. J. H., Bicev, R. N., Cerqueira, F. M., da Cunha, F. M., Denicola, A., Gomes, F., Miyamoto, S., Netto, L. E. S., Randall, L. M., Stevani, C. V., & Thomson, L. (2021). Oxidative Modification of Proteins: From Damage to Catalysis, Signaling, and Beyond. *Antioxidants & redox signaling*, *35*(12), 1016–1080. <https://doi.org/10.1089/ars.2020.8176>
85. Di Grigoli, A., Francesca, N., Gaglio, R., Guarrasi, V., Moschetti, M., Scatassa, M. L., Settanni, L., & Bonanno, A. (2015). The influence of the wooden equipment employed for cheese manufacture on the characteristics of a traditional stretched cheese during ripening. *Food microbiology*, *46*, 81–91. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.07.008>
86. Didiene, R., Defargues, C., Callon, C., Meylheuc, T., Hulin, S., & Montel, M. C. (2012). Characteristics of microbial biofilm on wooden vats ('gerles') in PDO Salers cheese. *International journal of food microbiology*, *156*(2), 91–101. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.007>
87. Dikbaş N, Orman YC, Alım Ş et al (2023) Evaluating *Enterococcus faecium* 9 N-2 as a probiotic candidate from traditional village white cheese. *Food Sci Nutr* *12*(3):1847–1856. <https://doi.org/10.1002/fsn3.3878>.
88. Divyashri, G., Krishna, G., Muralidhara, & Prapulla, S. G. (2015). Probiotic attributes, antioxidant, anti-inflammatory and neuromodulatory effects of *Enterococcus faecium* CFR 3003: in vitro and in vivo evidence. *Journal of medical microbiology*, *64*(12), 1527–1540. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000184>
89. Dobson, A., Cotter, P. D., Ross, R. P., & Hill, C. (2012). Bacteriocin production: a probiotic trait?. *Applied and environmental microbiology*, *78*(1), 1–6. <https://doi.org/10.1128/AEM.05576-11>
90. Doi Y. (2018). Lactic acid fermentation is the main aerobic metabolic pathway in *Enterococcus faecalis* metabolizing a high concentration of glycerol. *Applied microbiology and biotechnology*, *102*(23), 10183–10192. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9351-4>

91. Domingos-Lopes, M. F. P., Stanton, C., Ross, P. R., Dapkevicius, M. L. E., & Silva, C. C. G. (2017). Genetic diversity, safety and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese. *Food microbiology*, *63*, 178–190. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.11.014>
92. Drab, Vladimir & Kavkova, Miloslava & Markéta, Markvartová & Jaroslava, Hanáková & Petr, Roubal. (2019). Microbial diversity of Livanjski cheese with the emphasis on lactic acid bacteria based on culture-dependent and sequencing method. *International Journal of Dairy Technology*, *73*. 10.1111/1471-0307.12638.
93. DSMZ. LPSN-List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature. 2020. Available online: <https://lpsn.dsmz.de/> (accessed on 10 February 2021)
94. Dunny, G. M. (2007). The peptide pheromone-inducible conjugation system of *Enterococcus faecalis* plasmid pCF10: cell-cell signalling, gene transfer, complexity and evolution. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, *362(1483)*, 1185–1193. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2043>
95. Dunny, G.M. (2010). Analogous telesensing pathways regulate mating and virulence in two opportunistic human pathogens. *mBIO.*; *1*:181–186. doi: 10.1128/mBio.00181-10.
96. Duprè, I., Zanetti, S., Schito, A. M., Fadda, G., & Sechi, L. A. (2003). Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates collected in Sardinia (Italy). *Journal of medical microbiology*, *52(Pt 6)*, 491–498. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.05038-0>
97. Eaton, T. J., & Gasson, M. J. (2001). Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Applied and environmental microbiology*, *67(4)*, 1628–1635. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.4.1628-1635.2001>
98. Echeverria-Esnal, D., Sorli, L., Navarrete-Rouco, M. E., Prim, N., Barcelo-Vidal, J., Conde-Estévez, D., Montero, M. M., Martin-Ontiyuelo, C., Horcajada, J. P., & Grau, S. (2023). Ampicillin-resistant and vancomycin-susceptible

- Enterococcus faecium* bacteremia: a clinical narrative review. *Expert review of anti-infective therapy*, 21(7), 759–775.  
<https://doi.org/10.1080/14787210.2023.2223977>
99. Edgar R. C. (2013). UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature methods*, 10(10), 996–998.  
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2604>
100. EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) (2012). Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA Journal*;10(6):2740. [10 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2012.2740.
101. Eguchi, T., Kaminaka, K., Shima, J., Kawamoto, S., Mori, K., Choi, S. H., Doi, K., Ohmomo, S., & Ogata, S. (2001). Isolation and characterization of enterocin SE-K4 produced by thermophilic enterococci, *Enterococcus faecalis* K-4. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 65(2), 247–253.  
<https://doi.org/10.1271/bbb.65.247>
102. Elnar, A. G., & Kim, G. B. (2025). Probiotic potential and safety assessment of bacteriocinogenic *Enterococcus faecalis* CAUM157. *Frontiers in microbiology*, 16, 1563444. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1563444>
103. Elsner, H. A., Sobottka, I., Mack, D., Claussen, M., Laufs, R., & Wirth, R. (2000). Virulence factors of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* blood culture isolates. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 19(1), 39–42. <https://doi.org/10.1007/s100960050007>
104. Essa, M. O. A., Cheng, C., Chen, L., Chi, G. Y., Abdelhadi, L. A. M., Hassan, H. A., Yaqoob, S., Adam, S. Y., Husien, H. M., Saleh, A. A., & Cheng, D. (2025). Effects of *Bacteroides fragilis* and *Enterococcus faecium* administration as probiotic candidates: impact on growth performance, organ indices, and gut microbiota balance in mice. *Veterinary sciences*, 12(11), 1093.  
<https://doi.org/10.3390/vetsci12111093>

105. Esteban-Torres, M., Santamaría, L., Cabrera-Rubio, R., Plaza-Vinuesa, L., Crispie, F., de Las Rivas, B., Cotter, P., & Muñoz, R. (2018). A Diverse range of human gut bacteria have the potential to metabolize the dietary component gallic acid. *Applied and environmental microbiology*, *84*(19), e01558-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.01558-18>
106. European Medicines Agency (EMA) (2020) Use of pleuromutilins in food-producing animals in the European Union.
107. Ezepchuk, Yurii V. (2022). Biological Concept of Bacterial Pathogenicity (Theoretical Review). *Research Advances in Microbiology and Biotechnology Vol. 1*, 36–47. <https://doi.org/10.9734/bpi/ramb/v1/4072E>
108. Farrow, J.A., & Collins, M.D. (1985). *Enterococcus hirae*, a new species that includes amino acid assay strain NCDO 1258 and strains causing growth depression in young chickens. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *35*, 73-75.
109. Feng Y, Qiao L, Liu R et al (2017) Potential probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from the intestinal mucosa of healthy piglets. *Ann Microbiol* *67*, 239–253. <https://doi.org/10.1007/s13213-017-1254-6>
110. Fernández-Fernández, Rosa & Elsherbini, Ahmed & Lozano, Carmen & Martínez, Agustí & de Toro, María & Zarazaga, Myriam & Peschel, Andreas & Krismer, Bernhard & Torres, Carmen. (2023). Genomic Analysis of Bacteriocin-Producing *Staphylococci*: High Prevalence of Lanthipeptides and the Micrococcin P1 Biosynthetic Gene Clusters. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, *17*, 159-174. [10.1007/s12602-023-10119-w](https://doi.org/10.1007/s12602-023-10119-w).
111. Fiore, E., Van Tyne, D., & Gilmore, M. S. (2019). Pathogenicity of *Enterococci*. *Microbiology spectrum*, *7*(4), 10.1128/microbiolspec.gpp3-0053-2018. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0053-2018>
112. Firat, O., Makay, O., Yeniay, L., Gokce, G., Yenisey, C., & Coker, A. (2017). Omega-3 fatty acids inhibit oxidative stress in a rat model of liver regeneration. *Annals of surgical treatment and research*, *93*(1), 1–10. <https://doi.org/10.4174/ast.2017.93.1.1>

113. Fortina, M. G., Ricci, G., Borgo, F., Manachini, P. L., Arends, K., Schiwon, K., Abajy, M. Y., & Grohmann, E. (2008). A survey on biotechnological potential and safety of the novel *Enterococcus* species of dairy origin, *E. italicus*. *International journal of food microbiology*, *123*(3), 204–211. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.01.014>
114. Franciosi, E., Carafa, I., Nardin, T., Schiavon, S., Poznanski, E., Cavazza, A., Larcher, R., & Tuohy, K. M. (2015). Biodiversity and  $\gamma$ -aminobutyric acid production by lactic acid bacteria isolated from traditional alpine raw cow's milk cheeses. *BioMed research international*, *2015*, 625740. <https://doi.org/10.1155/2015/625740>
115. Franz, C. M., Huch, M., Abriouel, H., Holzapfel, W., & Gálvez, A. (2011). *Enterococci* as probiotics and their implications in food safety. *International journal of food microbiology*, *151*(2), 125–140. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.014>
116. Franz, C. M., Stiles, M. E., Schleifer, K. H., & Holzapfel, W. H. (2003). *Enterococci* in foods - a conundrum for food safety. *International journal of food microbiology*, *88*(2-3), 105–122. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(03\)00174-0](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(03)00174-0)
117. Franz, C. M., van Belkum, M. J., Holzapfel, W. H., Abriouel, H., & Gálvez, A. (2007). Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS microbiology reviews*, *31*(3), 293–310. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00064.x>
118. Funck, Graciele. (2014). Evaluation of Probiotic Characteristics of Lactic Acid Bacteria Isolated from Artisan Cheese. *Journal of Food Safety*, *34*. [10.1111/jfs.12138](https://doi.org/10.1111/jfs.12138).
119. Fux, C. A., Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Stoodley, P. (2005). Survival strategies of infectious biofilms. *Trends in microbiology*, *13*(1), 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.11.010>
120. Gaca, A. O., & Lemos, J. A. (2019). Adaptation to Adversity: the Intermingling of Stress Tolerance and Pathogenesis in *Enterococci*.

- Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 83(3), e00008-19.  
<https://doi.org/10.1128/MMBR.00008-19>
121. Gaglio, R., Couto, N., Marques, C., de Fatima Silva Lopes, M., Moschetti, G., Pomba, C., & Settanni, L. (2016). Evaluation of antimicrobial resistance and virulence of enterococci from equipment surfaces, raw materials, and traditional cheeses. *International journal of food microbiology*, 236, 107–114.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.020>
122. Gajewska, J., Chajęcka-Wierzchowska, W., Byczkowska-Rostkowska, Z., & Saki, M. (2023). Biofilm formation capacity and presence of virulence determinants among *Enterococcus* species from milk and raw milk cheeses. *Life*, 13(2), 495.
123. Gao, W., Howden, B. P., & Stinear, T. P. (2018). Evolution of virulence in *Enterococcus faecium*, a hospital-adapted opportunistic pathogen. *Current opinion in microbiology*, 41, 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.11.030>
124. García-Solache, M., & Rice, L. B. (2019). The *Enterococcus*: a model of adaptability to its environment. *Clinical microbiology reviews*, 32(2), e00058-18. <https://doi.org/10.1128/CMR.00058-18>
125. Gardiner, G. E., Ross, R. P., Wallace, J. M., Scanlan, F. P., Jägers, P. P., Fitzgerald, G. F., Collins, J. K., & Stanton, C. (1999). Influence of a probiotic adjunct culture of *Enterococcus faecium* on the quality of cheddar cheese. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(12), 4907–4916.  
<https://doi.org/10.1021/jf990277m>.
126. Garroni, E., Doulgeraki, A. I., Pavli, F., Spiteri, D., & Valdramidis, V. P. (2020). Characterization of indigenous lactic acid bacteria in cow milk of the Maltese Islands: a geographical and seasonal assessment. *Microorganisms*, 8(6), 812. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060812>
127. Gebicka, L., & Krych-Madej, J. (2019). The role of catalases in the prevention/promotion of oxidative stress. *Journal of inorganic biochemistry*, 197, 110699. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.110699>

128. Gelsomino, R., Vancanneyt, M., Cogan, T. M., Condon, S., & Swings, J. (2002). Source of enterococci in a farmhouse raw-milk cheese. *Applied and environmental microbiology*, *68*(7), 3560–3565. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.7.3560-3565.2002>
129. Geniş, B., & Tuncer, Y. (2026). Technological properties and safety evaluation of bacteriocinogenic *Enterococcus* strains isolated from raw meat and traditional meat products in Türkiye. *BMC Microbiology*, *26*(1), 474.
130. Ghattargi, V. C., Gaikwad, M. A., Meti, B. S., Nimonkar, Y. S., Dixit, K., Prakash, O., Shouche, Y. S., Pawar, S. P., & Dhotre, D. P. (2018). Comparative genome analysis reveals key genetic factors associated with probiotic property in *Enterococcus faecium* strains. *BMC genomics*, *19*(1), 652. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5043-9>
131. Gilmore, M. S., Clewell, D. B., Ike, Y., & Shankar, N. (Eds.). (2014). *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 5–63.
132. Giraffa G. (2002). *Enterococci* from foods. *FEMS microbiology reviews*, *26*(2), 163–171. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00608.x>.
133. Gobbetti, M., De Angelis, M., Di Cagno, R., Minervini, F., & Limitone, A. (2007). Cell-cell communication in food related bacteria. *International journal of food microbiology*, *120*(1-2), 34–45. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.012>
134. Gonçalves, M. T. P., Benito, M. J., Córdoba, M. G., Egas, C., Merchán, A. V., Galván, A. I., & Ruiz-Moyano, S. (2018). Bacterial communities in Serpa cheese by culture dependent techniques, 16S rRNA gene sequencing and high-throughput sequencing analysis. *Journal of food science*, *83*(5), 1333–1341. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14141>
135. Graham, K., Stack, H., & Rea, R. (2020). Safety, beneficial and technological properties of enterococci for use in functional food applications - a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, *60*(22), 3836–3861. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1709800>

136. Grant, J. R., Enns, E., Marinier, E., Mandal, A., Herman, E. K., Chen, C. Y., Graham, M., Van Domselaar, G., & Stothard, P. (2023). Proksee: in-depth characterization and visualization of bacterial genomes. *Nucleic acids research*, *51(W1)*, W484–W492. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad326>
137. Grein, F., Schneider, T., & Sahl, H. G. (2019). Docking on Lipid II-A Widespread Mechanism for Potent Bactericidal Activities of Antibiotic Peptides. *Journal of molecular biology*, *431(18)*, 3520–3530. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.05.014>
138. Grujović, Mirjana & Mladenović Marković, Katarina & Žugić-Petrović, Tanja & Čomić, Ljiljana. (2018). Characterization of lactic acid bacteria isolated from traditionally made Serbian Cheese and evaluation of their antagonistic potential against *Enterobacteriaceae*. *Journal of Food Processing and Preservation*, *42*. 10.1111/jfpp.13577.
139. Guarrasi, V., Sannino, C., Moschetti, M., Bonanno, A., Di Grigoli, A., & Settanni, L. (2017). The individual contribution of starter and non-starter lactic acid bacteria to the volatile organic compound composition of Caciocavallo Palermitano cheese. *International journal of food microbiology*, *259*, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.07.022>
140. Guo, Ling & Liu, Biqi. (2023). Nonstarter Lactic Acid Bacteria in Cheese. 10.1039/BK9781839169908-00048.
141. Gútiez, L., Borrero, J., Jiménez, J. J., Gómez-Sala, B., Recio, I., Cintas, L. M., Herranz, C., & Hernández, P. E. (2014). Genetic and biochemical evidence that recombinant *Enterococcus* spp. strains expressing gelatinase (GelE) produce bovine milk-derived hydrolysates with high angiotensin converting enzyme-inhibitory activity (ACE-IA). *Journal of agricultural and food chemistry*, *62(24)*, 5555–5564. <https://doi.org/10.1021/jf5006269>
142. Hammad, Ahmed & Hassan, Hamdy & Shimamoto, Tadashi. (2015). Prevalence, antibiotic resistance and virulence of *Enterococcus* spp. in Egyptian fresh raw milk cheese. *Food Control*, *50*. 815-820. 10.1016/j.foodcont.2014.10.020.

143. Hanchi, H., Mottawea, W., Sebei, K., & Hammami, R. (2018). The genus *Enterococcus*: between probiotic potential and safety concerns-an update. *Frontiers in microbiology*, *9*, 1791. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01791>
144. Hancock, L. E., & Gilmore, M. S. (2002). The capsular polysaccharide of *Enterococcus faecalis* and its relationship to other polysaccharides in the cell wall. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(3), 1574–1579. <https://doi.org/10.1073/pnas.032448299>
145. Hancock, L. E., Murray, B. E., & Sillanpää, J. (2014). Enterococcal Cell Wall Components and Structures. In M. S. Gilmore (Eds.) et. al., *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Massachusetts Eye and Ear Infirmary.
146. Hanzelová, Z., Dudriková, E., Lovayová, V., Výrostková, J., Regecová, I., Zigo, F., & Bartáková, K. (2024). Occurrence of enterococci in the process of artisanal cheesemaking and their antimicrobial resistance. *Life*, *14*(7), 890.
147. Hazards, EFSA & Cocconcelli, Pier Sandro & Richard-Forget, Florence & Klein, Gunter & Licht, Tine & Peixe, Luísa & Nguyen-The, Christophe & Querol, Amparo & Thrane, Ulf & Vlack, Just & Wright, Atte. (2011). Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2011 update). *EFSA Journal*, *9*982. [10.2903/j.efsa.2011.2497](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2497).
148. He, Y., Dong, B., Xie, K., Hu, Y., Huang, Y., Tao, X., & Wei, H. (2025). *Enterococcus faecium* WEFA23-Derived Surface Layer Protein OTC Prevents *Listeria monocytogenes* Invasion by Strengthening Intestinal Barrier Function and Modulating Immune Responses. *Foods (Basel, Switzerland)*, *14*(23), 4110. <https://doi.org/10.3390/foods14234110>
149. He, Y., Liu, Z., Huang, Y., Qiu, L., Tao, X., & Wei, H. (2025). A review on the ecological niche and functional properties of enterococci in health promotion. *Current research in food science*, *11*, 101211. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2025.101211>

150. Heilbronner, S., Krismer, B., Brötz-Oesterhelt, H., & Peschel, A. (2021). The microbiome-shaping roles of bacteriocins. *Nature reviews. Microbiology*, *19(11)*, 726–739. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00569-w>
151. Herr, J. R., Opik, M., & Hibbett, D. S. (2015). Towards the unification of sequence-based classification and sequence-based identification of host-associated microorganisms. *The New phytologist*, *205(1)*, 27–31. <https://doi.org/10.1111/nph.13180>
152. Hollenbeck, B. L., & Rice, L. B. (2012). Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. *Virulence*, *3(5)*, 421–433. <https://doi.org/10.4161/viru.21282>
153. Homayouni, Aziz & Ansari, Fereshteh & Azizi, Aslan & Pourjafar, Hadi & Madadi, Masuod. (2018). Cheese as a potential food carrier to deliver probiotic microorganisms into the human gut: a review. *Current Nutrition & Food Science*, *14*. [10.2174/1573401314666180817101526](https://doi.org/10.2174/1573401314666180817101526).
154. Huang, F., Zhang, F., Xu, D., Zhang, Z., Xu, F., Tao, X., Qiu, L., & Wei, H. (2018). *Enterococcus faecium* WEFA23 from infants lessens high-fat-diet-induced hyperlipidemia via cholesterol 7-alpha-hydroxylase gene by altering the composition of gut microbiota in rats. *Journal of dairy science*, *101(9)*, 7757–7767. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13713>
155. Huang, G., Zheng, Y., Zhang, N., Huang, G., Zhang, W., Li, Q., & Ren, X. (2024). *Desulfovibrio vulgaris* caused gut inflammation and aggravated DSS-induced colitis in C57BL/6 mice model. *Gut pathogens*, *16(1)*, 39. <https://doi.org/10.1186/s13099-024-00632-w>
156. Hussien, H., Abd-Rabou, H. S., & Saad, M. A. (2022). The impact of incorporating *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin with inulin and FOS on yogurt quality. *Scientific reports*, *12(1)*, 13401. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-17633-x>
157. Huycke, M.M., Hancock, L.E. Semedo-Lemsaddek, T., Barreto-Crespo, M.T., Tenreiro, R. (2012). *Enterococcus* and Safety. Nova Science Publishers,

- Inc; New York: *Enterococcal physiology and cell wall structure and dynamics*, pp. 21–57
158. Ighodaro, Osasenaga & Akinloye, Oluseyi. (2017). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, 54. 10.1016/j.ajme.2017.09.001.
159. Im, E. J., Lee, H. H., Kim, M., & Kim, M. K. (2023). Evaluation of enterococcal probiotic usage and review of potential health benefits, safety, and risk of antibiotic-resistant strain emergence. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 12(8), 1327. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12081327>
160. İncili, G. K., Karatepe, P., Akgöl, M., Güngören, A., Koluman, A., İlhak, O. İ., Kanmaz, H., Kaya, B., & Hayaloğlu, A. A. (2022). Characterization of lactic acid bacteria postbiotics, evaluation in-vitro antibacterial effect, microbial and chemical quality on chicken drumsticks. *Food microbiology*, 104, 104001. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104001>
161. Indira, M., Venkateswarulu, T. C., Abraham Peele, K., Nazneen Bobby, M., & Krupanidhi, S. (2019). Bioactive molecules of probiotic bacteria and their mechanism of action: a review. *3 Biotech*, 9(8), 306. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1841-2>
162. Ispirli, H.; Demirba,s, F.; Dertli, E. (2017). Characterization of functional properties of *Enterococcus* spp. Isolated from Turkish white cheese. *LWT Food Sci. Technol.*, 75, 358–365.
163. Jahansepas, A., Sharifi, Y., Aghazadeh, M., & Ahangarzadeh Rezaee, M. (2020). Comparative analysis of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* strains isolated from clinical samples and traditional cheese types in the Northwest of Iran: antimicrobial susceptibility and virulence traits. *Archives of microbiology*, 202(4), 765–772. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01792-z>
164. Jamet, E., Akary, E., Poisson, M. A., Chamba, J. F., Bertrand, X., & Serror, P. (2012). Prevalence and characterization of antibiotic resistant

- Enterococcus faecalis* in French cheeses. *Food microbiology*, 31(2), 191–198.  
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.03.009>
165. Jaumaux, F., Petit, K., Martin, A., Rodriguez-Villalobos, H., Vermeersch, M., Perez-Morga, D., & Gabant, P. (2023). Selective Bacteriocins: A Promising Treatment for *Staphylococcus aureus* Skin Infections Reveals Insights into Resistant Mutants, Vancomycin Resistance, and Cell Wall Alterations. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 12(6), 947.  
<https://doi.org/10.3390/antibiotics12060947>
166. Jenzano, J. W., Hogan, S. L., & Lundblad, R. L. (1986). Factors influencing measurement of human salivary lysozyme in lysoplate and turbidimetric assays. *Journal of clinical microbiology*, 24(6), 963–967.  
<https://doi.org/10.1128/jcm.24.6.963-967.1986>
167. Jett, B. D., Huycke, M. M., & Gilmore, M. S. (1994). Virulence of enterococci. *Clinical microbiology reviews*, 7(4), 462–478.  
<https://doi.org/10.1128/CMR.7.4.462>
168. John, O. P., Afolabi, K. O., Ngene, A. C., Tanimowo, W. O., Adewoyin, M. A., Osho, M. B., & Reuben, R. C. (2026). Enterococcus Species: Multifaceted Probiotic Potential and Safety Considerations. *Microorganisms*, 14(4), 815. <https://doi.org/10.3390/microorganisms14040815>
169. Johnson, C. N., Sheriff, E. K., Duerkop, B. A., & Chatterjee, A. (2021). Let Me Upgrade You: Impact of Mobile Genetic Elements on Enterococcal Adaptation and Evolution. *Journal of bacteriology*, 203(21), e0017721.  
<https://doi.org/10.1128/JB.00177-21>
170. Johnson, E. M., Jung, D. Y., Jin, D. Y., Jayabalan, D. R., Yang, D. S. H., & Suh, J. W. (2018). Bacteriocins as food preservatives: Challenges and emerging horizons. *Critical reviews in food science and nutrition*, 58(16), 2743–2767. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1340870>
171. Jomova, K., Raptova, R., Alomar, S. Y., Alwasel, S. H., Nepovimova, E., Kuca, K., & Valko, M. (2023). Reactive oxygen species, toxicity, oxidative

- stress, and antioxidants: chronic diseases and aging. *Archives of toxicology*, 97(10), 2499–2574. <https://doi.org/10.1007/s00204-023-03562-9>
172. Juan, C. A., Pérez de la Lastra, J. M., Plou, F. J., & Pérez-Lebeña, E. (2021). The Chemistry of reactive oxygen species (ROS) revisited: outlining their role in biological macromolecules (DNA, lipids and proteins) and induced pathologies. *International journal of molecular sciences*, 22(9), 4642. <https://doi.org/10.3390/ijms22094642>
173. Kagkli, D. M., Vancanneyt, M., Hill, C., Vandamme, P., & Cogan, T. M. (2007). *Enterococcus* and *Lactobacillus* contamination of raw milk in a farm dairy environment. *International journal of food microbiology*, 114(2), 243–251. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.09.016>
174. Kagkli, D. M., Vancanneyt, M., Vandamme, P., Hill, C., & Cogan, T. M. (2007). Contamination of milk by enterococci and coliforms from bovine faeces. *Journal of applied microbiology*, 103(5), 1393–1405. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03338.x>
175. Karas, M., & Hillenkamp, F. (1988). Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical chemistry*, 60(20), 2299–2301. <https://doi.org/10.1021/ac00171a028>
176. Kassem, M. A., Saafan, A. E., Bayomy, F., & El-Gendy, A. O. (2021). Exploring clinically isolated *Staphylococcus* sp. bacteriocins revealed the production of amonabactin, micrococcin, and  $\alpha$ -circulocin. *Iranian journal of microbiology*, 13(2), 212–224. <https://doi.org/10.18502/ijm.v13i2.5983>
177. Kayser F. H. (2003). Safety aspects of enterococci from the medical point of view. *International journal of food microbiology*, 88(2-3), 255–262. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(03\)00188-0](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(03)00188-0)
178. Kieliszek, M., Pobiega, K., Piwowarek, K., & Kot, A. M. (2021). Characteristics of the Proteolytic Enzymes Produced by Lactic Acid Bacteria. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(7), 1858. <https://doi.org/10.3390/molecules26071858>

179. Kim, Se-Hyung & Kim, Dong-Hyeon & Lim, Hyun-Woo & Seo, Kun-Ho. (2020). High prevalence of non-faecalis and non-faecium *Enterococcus* spp. in farmstead cheesehouse and their applicability as hygiene indicators. *LWT*, *126*. 109271. [10.1016/j.lwt.2020.109271](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109271).
180. Kiruthiga, A., Padmavathy, K., Shabana, P., Naveenkumar, V., Gnanadesikan, S., & Malaiyan, J. (2020). Improved detection of *esp*, *hyl*, *asa1*, *gelE*, *cylA* virulence genes among clinical isolates of *Enterococci*. *BMC research notes*, *13(1)*, 170. <https://doi.org/10.1186/s13104-020-05018-0>
181. Kishino, Shigenobu & Ogawa, Jun & Omura, Yoriko & Matsumura, Kenji & Shimizu, Sakayu. (2002). Conjugated linoleic acid production from linoleic acid by lactic acid bacteria. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *79*. 159-163. [10.1007/s11746-002-0451-4](https://doi.org/10.1007/s11746-002-0451-4).
182. Knudsen, M. J. S., Castruita, J. A. S., Rubin, I. M. C., Mollerup, S., Johansen, H. K., Marvig, R. L., & Pinholt, M. (2025). Genomic epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in Eastern Denmark from 2020 to 2022, and identification of vanB Tn 1549 insertion sites. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, *44(6)*, 1425-1432.
183. Kolmogorov, M., Yuan, J., Lin, Y., & Pevzner, P. A. (2019). Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs. *Nature biotechnology*, *37(5)*, 540–546. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0072-8>
184. Korhonen, Hannu. (2009). Milk-derived bioactive peptides: from science to applications. *Journal of Functional Foods*, *1*. [10.1016/j.jff.2009.01.007](https://doi.org/10.1016/j.jff.2009.01.007).
185. Krawczyk, B., Wityk, P., Gałęcka, M., & Michalik, M. (2021). The Many Faces of *Enterococcus* spp.-Commensal, Probiotic and Opportunistic Pathogen. *Microorganisms*, *9(9)*, 1900. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091900>
186. Ladero, V., Fernández, M., Calles-Enríquez, M., Sánchez-Llana, E., Cañedo, E., Martín, M. C., & Alvarez, M. A. (2012). Is the production of the biogenic amines tyramine and putrescine a species-level trait in enterococci? *Food microbiology*, *30(1)*, 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.12.016>

187. Lakshminarayanan, B., Guinane, C. M., O'Connor, P. M., Coakley, M., Hill, C., Stanton, C., O'Toole, P. W., & Ross, R. P. (2013). Isolation and characterization of bacteriocin-producing bacteria from the intestinal microbiota of elderly Irish subjects. *Journal of applied microbiology*, *114*(3), 886–898. <https://doi.org/10.1111/jam.12085>
188. Lancefield, R.C. (1933). A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *The Journal of experimental medicine*, *57*(4), 571–595. <https://doi.org/10.1084/jem.57.4.571>
189. Lau, L. Y. J., & Quek, S. Y. (2024). Probiotics: Health benefits, food application, and colonization in the human gastrointestinal tract. *Food Bioengineering*, *3*, 41–64. <https://doi.org/10.1002/fbe2.12078>.
190. Laulund, S., Wind, A., Derkx, P. M. F., & Zuliani, V. (2017). Regulatory and Safety Requirements for Food Cultures. *Microorganisms*, *5*(2), 28. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5020028>
191. Laux, C., Peschel, A., & Krismer, B. (2019). *Staphylococcus aureus* Colonization of the Human Nose and Interaction with Other Microbiome Members. *Microbiology spectrum*, *7*(2), 10.1128/microbiolspec.gpp3-0029-2018. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0029-2018>
192. LeBlanc, J. G., Milani, C., de Giori, G. S., Sesma, F., van Sinderen, D., & Ventura, M. (2013). Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective. *Current opinion in biotechnology*, *24*(2), 160–168. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.08.005>
193. Lebreton, F., Manson, A. L., Saavedra, J. T., Straub, T. J., Earl, A. M., & Gilmore, M. S. (2017). Tracing the enterococci from Paleozoic Origins to the hospital. *Cell*, *169*(5), 849–861.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.027>
194. Legan, T. B., Lavoie, B., & Mawe, G. M. (2022). Direct and indirect mechanisms by which the gut microbiota influence host serotonin systems. *Neurogastroenterology and motility*, *34*(10), e14346. <https://doi.org/10.1111/nmo.14346>

195. Łepecka, A., Szymański, P., Okoń, A., & Zielińska, D. (2023). Antioxidant activity of environmental lactic acid bacteria strains isolated from organic raw fermented meat products. *LWT-Food Science and Technology*, *174*, Article 114440. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114440>
196. Liang, Q., Zhou, W., Peng, S., Liang, Z., Liu, Z., Zhu, C., & Mou, H. (2025). Current status and potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria applied in the food industry. *Current research in food science*, *10*, 100997. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2025.100997>.
197. Liatsos, C., Papaefthymiou, A., Kyriakos, N., Galanopoulos, M., Doulberis, M., Giakoumis, M., Petridou, E., Mavrogiannis, C., Rokkas, T., & Kountouras, J. (2022). *Helicobacter pylori*, gastric microbiota and gastric cancer relationship: Unrolling the tangle. *World journal of gastrointestinal oncology*, *14*(5), 959–972. <https://doi.org/10.4251/wjgo.v14.i5.959>
198. Liu Y, Wang J, Wu C (2022) Modulation of Gut Microbiota and Immune System by Probiotics, Pre-biotics, and Post-biotics. *Front Nutr* 8:634897. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.634897>
199. Liu Z, Xu C, Tian R et al (2021) Screening beneficial bacteriostatic lactic acid bacteria in the intestine and studies of bacteriostatic substances. *J Zhejiang Univ Sci B* 22(7):533–547. <https://doi.org/10.1631/jzus.B2000602>
200. Liu, B., Zheng, D., Zhou, S., Chen, L., & Yang, J. (2022). VFDB 2022: a general classification scheme for bacterial virulence factors. *Nucleic acids research*, *50*(D1), D912–D917. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1107>
201. Liu, C., & Li, S. (2022). Engineered biosynthesis of plant polyketides by type III polyketide synthases in microorganisms. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, *10*, 1017190. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1017190>
202. Liu, Y. Y., Hsu, C. Y., Yang, Y. C., Huang, C. H., & Chen, C. C. (2023). ProbioMinServer: an integrated platform for assessing the safety and functional properties of potential probiotic strains. *Bioinformatics advances*, *3*(1), vbad153. <https://doi.org/10.1093/bioadv/vbad153>

203. Lortal, Sylvie & Chapot-Chartier, Marie-Pierre. (2005). Role, mechanisms and control of lactic acid bacteria lysis in cheese. *International Dairy Journal - INT DAIRY J*, 15, 857-871. [10.1016/j.idairyj.2004.08.024](https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.08.024)
204. Lu, K., Wang, X., Zhou, Y., & Zhu, Q. (2024). Genomic characterization and probiotic potential assessment of an exopolysaccharide-producing strain *Pediococcus pentosaceus* LL-07 isolated from fermented meat. *BMC microbiology*, 24(1), 142. <https://doi.org/10.1186/s12866-024-03304-6>
205. Lu, Y., Govindasamy-Lucey, S., & Lucey, J. A. (2016). Angiotensin-I-converting enzyme-inhibitory peptides in commercial Wisconsin Cheddar cheeses of different ages. *Journal of dairy science*, 99(1), 41–52. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9569>
206. Ludwig, W., Seewaldt, E., Kilpper-Bälz, R., Schleifer, K. H., Magrum, L., Woese, C. R., Fox, G. E., & Stackebrandt, E. (1985). The phylogenetic position of *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Journal of general microbiology*, 131(3), 543–551. <https://doi.org/10.1099/00221287-131-3-543>
207. Lynch, K. M., Zannini, E., Coffey, A., & Arendt, E. K. (2018). Lactic acid bacteria exopolysaccharides in foods and beverages: isolation, properties, characterization, and health benefits. *Annual review of food science and technology*, 9, 155–176. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030117-012537>
208. Magoč, T., & Salzberg, S. L. (2011). FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 27(21), 2957–2963. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr507>
209. Maietti, L., Bonvini, B., Huys, G., & Giraffa, G. (2007). Incidence of antibiotic resistance and virulence determinants among *Enterococcus italicus* isolates from dairy products. *Systematic and applied microbiology*, 30(6), 509–517. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2007.05.002>
210. Malek, R., El-Attar, A., Mohamed, M., Anwar, S., El-Soda, M., & Béal, C. (2012). Technological and safety properties display biodiversity among enterococci isolated from two Egyptian cheeses, "Ras" and "Domiat".

- International journal of food microbiology*, 153(3), 314–322.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.019>
211. Martin, J. D., & Mundt, J. O. (1972). *Enterococci* in insects. *Applied microbiology*, 24(4), 575–580. <https://doi.org/10.1128/am.24.4.575-580.1972>
212. Martínez, S., López, M., & Bernardo, A. (2003). Thermal inactivation of *Enterococcus faecium*: effect of growth temperature and physiological state of microbial cells. *Letters in applied microbiology*, 37(6), 475–481. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2003.01431.x>
213. Martini, Serena & Conte, Angela & Tagliazucchi, Davide. (2020). Effect of ripening and in vitro digestion on the evolution and fate of bioactive peptides in Parmigiano-Reggiano cheese. *International Dairy Journal*, 105. 104668. [10.1016/j.idairyj.2020.104668](https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104668).
214. Martino, G. P., Espariz, M., Gallina Nizo, G., Esteban, L., Blancato, V. S., & Magni, C. (2018). Safety assessment and functional properties of four enterococci strains isolated from regional Argentinean cheese. *International journal of food microbiology*, 277, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.012>
215. Martins, J., & Vasconcelos, V. (2015). Cyanobactins from Cyanobacteria: Current Genetic and Chemical State of Knowledge. *Marine drugs*, 13(11), 6910–6946. <https://doi.org/10.3390/md13116910>
216. Martins, J., Leikoski, N., Wahlsten, M., Azevedo, J., Antunes, J., Jokela, J., Sivonen, K., Vasconcelos, V., Fewer, D. P., & Leão, P. N. (2018). Sphaerocyclamide, a prenylated cyanobactin from the cyanobacterium *Sphaerospermopsis* sp. LEGE 00249. *Scientific reports*, 8(1), 14537. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32618-5>
217. Mc Donnell, M., Fitzgerald, R., Fhaoláin, I. N., Jennings, P. V., & O'Cuinn, G. (1997). Purification and characterization of aminopeptidase P from *Lactococcus lactis* subsp. cremoris. *The Journal of dairy research*, 64(3), 399–407. <https://doi.org/10.1017/s0022029997002318>

218. McArthur, A. G., Waglechner, N., Nizam, F., Yan, A., Azad, M. A., Baylay, A. J., Bhullar, K., Canova, M. J., De Pascale, G., Ejim, L., Kalan, L., King, A. M., Koteva, K., Morar, M., Mulvey, M. R., O'Brien, J. S., Pawlowski, A. C., Piddock, L. J., Spanogiannopoulos, P., Sutherland, A. D., Wright, G. D. (2013). The comprehensive antibiotic resistance database. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *57*(7), 3348–3357. <https://doi.org/10.1128/AAC.00419-13>
219. McAuley, C. M., Britz, M. L., Gobius, K. S., & Craven, H. M. (2015). Prevalence, seasonality, and growth of enterococci in raw and pasteurized milk in Victoria, Australia. *Journal of dairy science*, *98*(12), 8348–8358. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9335>
220. McAuley, C. M., Gobius, K. S., Britz, M. L., & Craven, H. M. (2012). Heat resistance of thermotolerant enterococci isolated from milk. *International journal of food microbiology*, *154*(3), 162–168. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.033>
221. McKenney, P. T., Ling, L., Wang, G., Mane, S., & Pamer, E. G. (2016). Complete genome sequence of *Enterococcus faecium* ATCC 700221. *Genome announcements*, *4*(3), e00386-16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00386-16>
222. McSweeney, P.L.H. (2004). Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*, *57*, 127-144. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2004.00147.x>
223. Mechoub, D., Meguenni, N., Titouche, Y., Elandoulsi, R. B., & Dhaouadi, S. (2025). Unveiling the probiotic potential of *Enterococcus* spp.: mechanisms and roles in animal and human health, a comprehensive review. *World journal of microbiology & biotechnology*, *41*(7), 214. <https://doi.org/10.1007/s11274-025-04389-5>
224. Mihailovskaya, V. S., Sutormin, D. A., Karipova, M. O., Trofimova, A. B., Mamontov, V. A., Severinov, K., & Kuznetsova, M. V. (2023). Bacteriocin-Producing *Escherichia coli* Q5 and C41 with Potential Probiotic Properties: In Silico, In Vitro, and In Vivo Studies. *International journal of molecular sciences*, *24*(16), 12636. <https://doi.org/10.3390/ijms241612636>

225. Milkovic, L., Cipak Gasparovic, A., Cindric, M., Mouthuy, P. A., & Zarkovic, N. (2019). Short Overview of ROS as cell function regulators and their implications in therapy concepts. *Cells*, 8(8), 793. <https://doi.org/10.3390/cells8080793>
226. Miller, J. R., Koren, S., & Sutton, G. (2010). Assembly algorithms for next-generation sequencing data. *Genomics*, 95(6), 315–327. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2010.03.001>
227. Miller, W. R., Munita, J. M., & Arias, C. A. (2014). Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert review of anti-infective therapy*, 12(10), 1221–1236. <https://doi.org/10.1586/14787210.2014.956092>
228. Millette, M., Cornut, G., Dupont, C., Shareck, F., Archambault, D., & Lacroix, M. (2008). Capacity of human nisin- and pediocin-producing lactic acid bacteria to reduce intestinal colonization by vancomycin-resistant enterococci. *Applied and environmental microbiology*, 74(7), 1997–2003. <https://doi.org/10.1128/AEM.02150-07>
229. Mills, S., Ross, R. P., & Hill, C. (2017). Bacteriocins and bacteriophage; a narrow-minded approach to food and gut microbiology. *FEMS microbiology reviews*, 41(Supp\_1), S129–S153. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux022>
230. Mills, S., Stanton, C., Hill, C., & Ross, R. P. (2011). New developments and applications of bacteriocins and peptides in foods. *Annual review of food science and technology*, 2, 299–329. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022510-133721>
231. Min, L. I., & Qian, L. I. U. (2021). Progress of catabolite control protein A in the regulation of metabolism and virulence of Gram-positive bacteria. *Journal of Shanghai Jiao Tong University (Medical Science)*, 41(4), 535-539.
232. Mokoena M. P. (2017). Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22(8), 1255. <https://doi.org/10.3390/molecules22081255>

233. Montalbán-López, M., Scott, T. A., Ramesh, S., Rahman, I. R., van Heel, A. J., Viel, J. H., Bandarian, V., Dittmann, E., Genilloud, O., Goto, Y., Grande Burgos, M. J., Hill, C., Kim, S., Koehnke, J., Latham, J. A., Link, A. J., Martínez, B., Nair, S. K., Nicolet, Y., Rebuffat, S., van der Donk, W. A. (2021). New developments in RiPP discovery, enzymology and engineering. *Natural product reports*, *38(1)*, 130–239. <https://doi.org/10.1039/d0np00027b>
234. Montel, M. C., Buchin, S., Mallet, A., Delbes-Paus, C., Vuitton, D. A., Desmasures, N., & Berthier, F. (2014). Traditional cheeses: rich and diverse microbiota with associated benefits. *International journal of food microbiology*, *177*, 136–154. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.019>
235. Moore, D. F., Guzman, J. A., & McGee, C. (2008). Species distribution and antimicrobial resistance of enterococci isolated from surface and ocean water. *Journal of applied microbiology*, *105(4)*, 1017–1025. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03828.x>
236. Morandi, S., Brasca, M., Andrighetto, C., Lombardi, A., & Lodi, R. (2006). Technological and molecular characterisation of enterococci isolated from north–west Italian dairy products. *International Dairy Journal*, *16*, 867–875.
237. Mrkonjic Fuka, M., Zgomba Maksimovic, A., Tanuwidjaja, I., Hulak, N., & Schloter, M. (2017). Characterization of enterococcal community isolated from an artisan Istrian raw milk cheese: biotechnological and safety aspects. *Food technology and biotechnology*, *55(3)*, 368–380. <https://doi.org/10.17113/ftb.55.03.17.5118>
238. Muguerza, B.; Ramos, M.; Sánchez, E.; Manso, M.A.; Miguel, M.; Aleixandre, A.; Delgado, M.A.; Recio, I. (2006). Antihypertensive activity of milk fermented by *Enterococcus faecalis* strains isolated from raw milk. *International Dairy Journal*, *26*, 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.01.001>
239. Mulani, M. S., Kamble, E. E., Kumkar, S. N., Tawre, M. S., & Pardesi, K. R. (2019). Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the Era of

- Antimicrobial Resistance: a review. *Frontiers in microbiology*, 10, 539.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00539>
240. Mull, R. W., Harrington, A., Sanchez, L. A., & Tal-Gan, Y. (2018). Cyclic peptides that govern signal transduction pathways: from prokaryotes to multi-cellular organisms. *Current topics in medicinal chemistry*, 18(7), 625–644.  
<https://doi.org/10.2174/1568026618666180518090705>
241. Müller, T., Ulrich, A., Ott, E. M., & Müller, M. (2001). Identification of plant-associated enterococci. *Journal of applied microbiology*, 91(2), 268–278.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01373.x>
242. Mundt J. O. (1963). Occurrence of enterococci in animals in a wild environment. *Applied microbiology*, 11(2), 136–140.  
<https://doi.org/10.1128/am.11.2.136-140.1963>
243. Mundy, L. M., Sahm, D. F., & Gilmore, M. (2000). Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clinical microbiology reviews*, 13(4), 513–522. <https://doi.org/10.1128/CMR.13.4.513>
244. Muñoz, A., Maqueda, M., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M., Rodríguez, A., & Valdivia, E. (2004). Biocontrol of psychrotrophic enterotoxigenic *Bacillus cereus* in a nonfat hard cheese by an enterococcal strain-producing enterocin AS-48. *Journal of food protection*, 67(7), 1517–1521. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-67.7.1517>
245. Mushynska V., Tistechok S., Gromyko O., Shtapenko O., Syrvatka V. (2024, November 19th-20th). Determining the optimum pH for cultivation *Enterococcus* sp. SB12 strain in industry. The V Scientific Conference of Young Researchers «Youth and Modern Problems of Microbiology and Virology: abstract book, Kyiv, Ukraine, P.31.
246. Mushynska V., Tistechok S., Gromyko O., Shtapenko O., Syrvatka V. (2025, May15th-16th). Investigation of biogenic amine production by the *Enterococcus* sp. SB12 strain. Materials of XXIII All-Ukrainian Scientific and Practical Conference of Young Scientists dedicated to the 110th anniversary of the Doctor of Biological Sciences, Professor, Honored Figure of Science and

Technology of Ukraine Zenoviy SKORODYNSKYI (16.09.1915–10.04.1985) and to the 100th anniversary of the Doctor of Biological Sciences, Professor, Academician of the UAAS Fedir PALFIY (03.03.1925–31.12.1996): «The Animal Biology», Lviv, Ukraine, P. 62

247. Mushynska V., Tistechok S., Slyvka, I., Tsisaryk O., Gromyko O., Shtapenko O., Syrvatka V. (2023, November 15th-16th). The effect of low pH and high temperatures on the survival of *Enterococcus* sp. SB12 strain. The International Scientific and Practical Conference «Modern aspects of microbiology, virology and biotechnology in wartime and post-war period»: abstract book, Kyiv, Ukraine, P.157-158.
248. Mushynska, V., Roman, I., Tistechok, S., Slyvka, I., Tsisaryk, O., Gromyko, O., Shtapenko, O., & Syrvatka, V. (2024). Draft genome sequence of *Enterococcus* sp. SB12 isolated from artisanal cheese of the Carpathian. *Microbiology resource announcements*, 13(1), e0086523. <https://doi.org/10.1128/MRA.00865-23>.
249. Mushynska, V., Tistechok, S., Roman, I., Slyvka, I., Tsisaryk, O., Gromyko, O., Shtapenko, O., & Syrvatka, V. (2025). Genome analysis and characterization of *Enterococcus* sp. SB12 isolated from Carpathian artisanal cheese. *Current microbiology*, 82(8), 349. <https://doi.org/10.1007/s00284-025-04337-4>
250. Nallapareddy, S. R., Singh, K. V., Duh, R. W., Weinstock, G. M., & Murray, B. E. (2000). Diversity of ace, a gene encoding a microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules, from different strains of *Enterococcus faecalis* and evidence for production of ace during human infections. *Infection and immunity*, 68(9), 5210–5217. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.9.5210-5217.2000>
251. Nallapareddy, S. R., Weinstock, G. M., & Murray, B. E. (2003). Clinical isolates of *Enterococcus faecium* exhibit strain-specific collagen binding mediated by Acm, a new member of the MSCRAMM family. *Molecular*

*microbiology*, 47(6), 1733–1747. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03417.x>

252. Nascimento, Liane & Casarotti, Sabrina & Todorov, Svetoslav & Penna, Ana. (2019). Probiotic potential and safety of enterococci strains. *Annals of Microbiology*, 69, 1-12. [10.1007/s13213-018-1412-5](https://doi.org/10.1007/s13213-018-1412-5).
253. Nash, A. K., Auchtung, T. A., Wong, M. C., Smith, D. P., Gesell, J. R., Ross, M. C., Stewart, C. J., Metcalf, G. A., Muzny, D. M., Gibbs, R. A., Ajami, N. J., & Petrosino, J. F. (2017). The gut mycobiome of the human microbiome project healthy cohort. *Microbiome*, 5(1), 153. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0373-4>
254. Nasrollahzadeh, A., Mollaei Tavani, S., Arjeh, E., & Jafari, S. M. (2023). Production of conjugated linoleic acid by lactic acid bacteria; important factors and optimum conditions. *Food chemistry: X*, 20, 100942. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2023.100942>
255. Natarajan, P., & Parani, M. (2015). First complete genome sequence of a probiotic *Enterococcus faecium* strain T-110 and its comparative genome analysis with pathogenic and non-pathogenic *Enterococcus faecium* genomes. *Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao*, 42(1), 43–46. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2014.07.002>
256. Nazıroğlu M. (2012). Molecular role of catalase on oxidative stress-induced Ca(2+) signaling and TRP cation channel activation in nervous system. *Journal of receptor and signal transduction research*, 32(3), 134–141. <https://doi.org/10.3109/10799893.2012.672994>
257. Ness, I. F., Diep, D. B., & Ike, Y. (2014). Enterococcal bacteriocins and antimicrobial proteins that contribute to niche control. In M. S. Gilmore (Eds.) et. al., *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Massachusetts Eye and Ear Infirmary.
258. Nicolescu, C. M., Bumbac, M., Buruleanu, C. L., Popescu, E. C., Stanescu, S. G., Georgescu, A. A., & Toma, S. M. (2023). Biopolymers

Produced by Lactic Acid Bacteria: Characterization and Food Application. *Polymers*, 15(6), 1539. <https://doi.org/10.3390/polym15061539>

259. Nidamarthi, Padmaja & Karlapudi, Abraham & Poongavanam, Senthamil. (2026). Screening and characterization of *Enterococcus faecium* as a potential probiotic: probiotic parameters and efficacy evaluation. *Biologia*, 81, 37. [10.1007/s11756-025-02074-4](https://doi.org/10.1007/s11756-025-02074-4).
260. Nieto-Arribas, P., Seseña, S., Poveda, J. M., Chicón, R., Cabezas, L., & Palop, L. (2011). *Enterococcus* populations in artisanal Manchego cheese: biodiversity, technological and safety aspects. *Food microbiology*, 28(5), 891–899. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.12.005>
261. Nilsen, R., Pripp, A. H., Høstmark, A. T., Haug, A., & Skeie, S. (2014). Short communication: Is consumption of a cheese rich in angiotensin-converting enzyme-inhibiting peptides, such as the Norwegian cheese Gamalost, associated with reduced blood pressure?. *Journal of dairy science*, 97(5), 2662–2668. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7479>
262. Nilsen, T., Nes, I. F., & Holo, H. (2003). Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Applied and environmental microbiology*, 69(5), 2975–2984. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.5.2975-2984.2003>
263. Norris, G. E., & Patchett, M. L. (2016). The glycocins: in a class of their own. *Current opinion in structural biology*, 40, 112–119. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2016.09.003>
264. Novais, C., Campos, J., Freitas, A. R., Barros, M., Silveira, E., Coque, T. M., Antunes, P., & Peixe, L. (2018). Water supply and feed as sources of antimicrobial-resistant *Enterococcus* spp. in aquacultures of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Portugal. *The Science of the total environment*, 625, 1102–1112. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.265>
265. Oancea, C., Klare, I., Witte, W., & Werner, G. (2004). Conjugative transfer of the virulence gene, esp, among isolates of *Enterococcus faecium* and

- Enterococcus faecalis*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 54(1), 232–235. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh249>
266. Ochoa, S. A., Escalona, G., Cruz-Córdova, A., Dávila, L. B., Saldaña, Z., Cázares-Domínguez, V., Eslava, C. A., López-Martínez, B., Hernández-Castro, R., Aquino-Jarquín, G., & Xicohtencatl-Cortés, J. (2013). Molecular analysis and distribution of multidrug-resistant *Enterococcus faecium* isolates belonging to clonal complex 17 in a tertiary care center in Mexico City. *BMC microbiology*, 13, 291. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-291>
267. Olson, R. D., Assaf, R., Brettin, T., Conrad, N., Cucinell, C., Davis, J. J., Dempsey, D. M., Dickerman, A., Dietrich, E. M., Kenyon, R. W., Kuscuoglu, M., Lefkowitz, E. J., Lu, J., Machi, D., Macken, C., Mao, C., Niewiadomska, A., Nguyen, M., Olsen, G. J., Overbeek, J. C., Stevens, R. L. (2023). Introducing the bacterial and viral bioinformatics resource center (BV-BRC): a resource combining PATRIC, IRD and ViPR. *Nucleic acids research*, 51(D1), D678–D689. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1003>
268. Olvera-García, M., Sanchez-Flores, A., & Quirasco Baruch, M. (2018). Genomic and functional characterisation of two *Enterococcus* strains isolated from Cotija cheese and their potential role in ripening. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(5), 2251–2267. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8765-3>
269. Ortigosa, M., Irigoyen, A., Urdin, M., García, S., Ibañez, F. C., & Torre, P. (2008). Sources of enterococci in Idiazábal-type cheese. *International journal of food microbiology*, 125(2), 146–152. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.035>
270. Oruc, O., Cetin, O., Onal Darilmaz, D., & Yüsekdağ, Z.N. (2021). Determination of the biosafety of potential probiotic *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* strains isolated from traditional white cheeses. *Lwt - Food Science and Technology*, 148, 111741.
271. O'Shea, E. F., Cotter, P. D., Stanton, C., Ross, R. P., & Hill, C. (2012). Production of bioactive substances by intestinal bacteria as a basis for explaining probiotic mechanisms: bacteriocins and conjugated linoleic acid. *International*

- journal of food microbiology*, 152(3), 189–205.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.05.025>
272. Oumer, B. A., Gaya, P., Fernández-García, E., Marciaca, R., Garde, S., Medina, M., & Nuñez, M. (2001). Proteolysis and formation of volatile compounds in cheese manufactured with a bacteriocin-producing adjunct culture. *The Journal of dairy research*, 68(1), 117–129.  
<https://doi.org/10.1017/s0022029900004568>
273. Ovchinnikov, K. V., Kranjec, C., Thorstensen, T., Carlsen, H., & Diep, D. B. (2020). Successful Development of Bacteriocins into Therapeutic Formulation for Treatment of MRSA Skin Infection in a Murine Model. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 64(12), e00829-20.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.00829-20>
274. Özdemir, Fatma Neslihan & Akcelik, Nefise & Akçelik, Mustafa. (2015). Incidence of antibiotic resistance and virulence determinants in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* strains, isolated from traditional cheeses in Turkey. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 30, 206-215.  
10.3103/S089141681504014X.
275. Özkan, Edibe & Demirci, Talha & Akın, Nihat. (2021). In vitro assessment of probiotic and virulence potential of *Enterococcus faecium* strains derived from artisanal goatskin casing Tulum cheeses produced in central Taurus Mountains of Turkey. *LWT*, 141. 110908. 10.1016/j.lwt.2021.110908.
276. Özlük, Gizem & Krausová, Gabriela. (2025). Gastric survival of lactic acid bacteria in probiotic-labelled products from the Turkish market: An *in vitro* study. *Czech Journal of Food Sciences*, 43. 344-351. 10.17221/36/2025-CJFS.
277. Paez, Roxana & Lavari, Luisina & Vinderola, G & Audero, Gabriela & Cuatrin, Alejandra & Zaritzky, Noemi & Reinheimer, Jorge. (2012). Effect of spray drying on the viability and resistance to simulated gastrointestinal digestion in lactobacilli. *Food Research International*. 48, 748 - 754.  
10.1016/j.foodres.2012.06.018.

278. Palmer, K. L., & Gilmore, M. S. (2010). Multidrug-resistant enterococci lack CRISPR-cas. *mBio*, *1*(4), e00227-10. <https://doi.org/10.1128/mBio.00227-10>
279. Palmer, K. L., Kos, V. N., & Gilmore, M. S. (2010). Horizontal gene transfer and the genomics of enterococcal antibiotic resistance. *Current opinion in microbiology*, *13*(5), 632–639. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.08.004>
280. Panattoni, A., Calvigioni, M., Benvenuti, L., D'Antongiovanni, V., Pellegrini, C., Di Salvo, C., Mazzantini, D., Celandroni, F., Fornai, M., Antonioli, L., & Ghelardi, E. (2022). The administration of *Enterococcus faecium* SF68 counteracts compositional shifts in the gut microbiota of diet-induced obese mice. *Frontiers in microbiology*, *13*, 1054097. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1054097>
281. Papadimitriou, K., Alegría, Á., Bron, P. A., de Angelis, M., Gobbetti, M., Kleerebezem, M., Lemos, J. A., Linares, D. M., Ross, P., Stanton, C., Turrone, F., van Sinderen, D., Varmanen, P., Ventura, M., Zúñiga, M., Tsakalidou, E., & Kok, J. (2016). Stress Physiology of Lactic Acid Bacteria. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, *80*(3), 837–890. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00076-15>
282. Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N., & Jensen, S. O. (2018). Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clinical microbiology reviews*, *31*(4), 10-1128.
283. Peng, Z., Wang, D., He, Y., Wei, Z., Xie, M., & Xiong, T. (2024). Gut distribution, impact factor, and action mechanism of bacteriocin-producing beneficial microbes as promising antimicrobial agents in gastrointestinal infection. *Probiotics and antimicrobial proteins*, *16*(5), 1516–1527. <https://doi.org/10.1007/s12602-024-10222-6>
284. Perin, L. M., Miranda, R. O., Todorov, S. D., Franco, B. D., & Nero, L. A. (2014). Virulence, antibiotic resistance and biogenic amines of bacteriocinogenic lactococci and enterococci isolated from goat milk.

- International journal of food microbiology, 185, 121–126.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.06.001>
285. Perin, Luana & Pereira, Juliano & Bersot, Luciano & Nero, Luís. (2019). The Microbiology of raw milk. 10.1016/B978-0-12-810530-6.00003-1.
286. Picon, Antonia & Garde, Sonia & Ávila, Marta & Nuñez, Manuel. (2016). Microbiota dynamics and lactic acid bacteria biodiversity in raw goat milk cheeses. *International Dairy Journal*, 58, 14-22. 10.1016/j.idairyj.2015.09.010.
287. Popović, N., Dinić, M., Tolinački, M., Mihajlović, S., Terzić-Vidojević, A., Bojić, S., Djokić, J., Golić, N., & Veljović, K. (2018). New insight into biofilm formation ability, the presence of virulence genes and probiotic potential of *Enterococcus* sp. dairy isolates. *Frontiers in microbiology*, 9, 78. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00078>
288. Powell, H. R., Islam, S. A., David, A., & Sternberg, M. J. E. (2025). Phyre2.2: A community resource for template-based protein structure prediction. *Journal of molecular biology*, 437(15), 168960. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2025.168960>
289. Pristavu, M. C., Diguță, F. C., Aldea, A. C., Badea, F., Dragoi Cudalbeanu, M., Ortan, A., & Matei, F. (2025). Functional profiling of *Enterococcus* and *Pediococcus* strains: an in vitro study on probiotic and postbiotic properties. *Microorganisms*, 13(6), 1348. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13061348>
290. Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic acids research*, 41(Database issue), D590–D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
291. Quirós, A., Ramos, M., Mugerza, B., Delgado, M.A., Miguel, M., Aleixandre, A., Recio, I. (2007). Identification of novel antihypertensive peptides in milk fermented with *Enterococcus faecalis*. *International Dairy Journal*, 17, 33–41

292. Rahmeh, R., Akbar, A., Kishk, M., Al Onaizi, T., Al-Shatti, A., Shajan, A., Akbar, B., Al-Mutairi, S., & Yateem, A. (2018). Characterization of semipurified enterocins produced by *Enterococcus faecium* strains isolated from raw camel milk. *Journal of dairy science*, *101*(6), 4944–4952. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13996>
293. Randazzo, C. L., Vaughan, E. E., & Caggia, C. (2006). Artisanal and experimental Pecorino Siciliano cheese: microbial dynamics during manufacture assessed by culturing and PCR-DGGE analyses. *International journal of food microbiology*, *109*(1-2), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.11.002>
294. Regazzo, D., Dalt, L.D., Lombardi, A., Andrighetto, C., Negro, A., & Gabai, G. (2010). Fermented milks from *Enterococcus faecalis* TH563 and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. bulgaricus LA2 manifest different degrees of ACE-inhibitory and immunomodulatory activities. *Dairy Science & Technology*, *90*, 469-476.
295. Reuben, R. C., & Torres, C. (2024). Bacteriocins: potentials and prospects in health and agrifood systems. *Archives of microbiology*, *206*(5), 233. <https://doi.org/10.1007/s00203-024-03948-y>
296. Ribeiro, S. C., Coelho, M. C., Todorov, S. D., Franco, B. D., Dapkevicius, M. L., & Silva, C. C. (2014). Technological properties of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from Pico cheese an artisanal cow's milk cheese. *Journal of applied microbiology*, *116*(3), 573–585. <https://doi.org/10.1111/jam.12388>
297. Ribeiro, S. C., Ross, R. P., Stanton, C., & Silva, C. C. G. (2017). Characterization and application of antilisterial enterocins on model fresh cheese. *Journal of food protection*, *80*(8), 1303–1316. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-031>
298. Riley, M. A., & Wertz, J. E. (2002). Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annual review of microbiology*, *56*, 117–137. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.161024>

299. Ríos Colombo, N. S., Perez-Ibarreche, M., Draper, L. A., O'Connor, P. M., Field, D., Ross, R. P., & Hill, C. (2023). Impact of bacteriocin-producing strains on bacterial community composition in a simplified human intestinal microbiota. *Frontiers in microbiology*, *14*, 1290697. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1290697>
300. Rosenbach, F.J. Mikro-Organismen bei den Wund-Infektions-Krankheiten des Menschen; Bergmann, J.F., Ed.; Verlag from J.F. Bergmann:Wiesbaden, Germany, 1884.
301. Ross, R.Paul & Stanton, Catherine & Hill, Colin & Fitzgerald, Gerald & Coffey, Aidan. (2000). Novel culture for cheese improvement. *Trends in Food Science & Technology*. *11*, 96-104. 10.1016/S0924-2244(00)00057-1.
302. Running, W. (1993). Computer software reviews. Chapman and hall dictionary of natural products on CD-ROM. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *33*, 934–935. <https://doi.org/10.1021/ci00016a603>
303. Ruppelt, D., Trollmann, M. F. W., Dema, T., Wirtz, S. N., Flegel, H., Mönnikes, S., Grond, S., Böckmann, R. A., & Steinem, C. (2024). The antimicrobial fibupeptide lugdunin forms water-filled channel structures in lipid membranes. *Nature communications*, *15*(1), 3521. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-47803-6>
304. Růžičková, M., Vítězová, M., & Kushkevych, I. (2020). The Characterization of *Enterococcus* Genus: Resistance Mechanisms and Inflammatory Bowel Disease. *Open medicine (Warsaw, Poland)*, *15*, 211–224. <https://doi.org/10.1515/med-2020-0032>
305. Saavedra, L., Taranto, M. P., Sesma, F., & de Valdez, G. F. (2003). Homemade traditional cheeses for the isolation of probiotic *Enterococcus faecium* strains. *International journal of food microbiology*, *88*(2-3), 241–245. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(03\)00186-7](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(03)00186-7)
306. Said, M. S., Tirthani, E., & Lesho, E. (2021). *Enterococcus* infections.
307. Salze, M., Muller, C., Bernay, B., Hartke, A., Clamens, T., Lesouhaitier, O., & Rincé, A. (2020). Study of key RNA metabolism proteins in *Enterococcus*

- faecalis*. *RNA biology*, 17(6), 794–804.  
<https://doi.org/10.1080/15476286.2020.1728103>
308. Santos Espinosa, Alejandro & Beltran-Barrientos, Lilia María & Reyes-Díaz, Ricardo & Mazorra-Manzano, Miguel & Hernandez, Adrian & Aguilar, Gustavo & Sayago-Ayerdi, Sonia & Vallejo-Cordoba, Belinda & González-Córdova, Aarón. (2020). Gamma-aminobutyric acid (GABA) production in milk fermented by specific wild lactic acid bacteria strains isolated from artisanal Mexican cheeses. *Annals of Microbiology*. 70, 10.1186/s13213-020-01542-3.
309. Sarantinopoulos, P., Kalantzopoulos, G., & Tsakalidou, E. (2002). Effect of *Enterococcus faecium* on microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Greek Feta cheese. *International journal of food microbiology*, 76(1-2), 93–105. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(02\)00021-1](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(02)00021-1)
310. Sarkar, Shovon & Hossain, & Monika, Sharmin & Sanyal, Santonu & Roy, Pravas & Hossain, Md. Iqbal & Jahid, Iqbal. (2020). Probiotic potential of *Pediococcus acidilactici* and *Enterococcus faecium* isolated from Indigenous yogurt and raw goat milk. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology*, 48. 276-286. 10.4014/mbl.1912.12009.
311. Şchiopu, P., Toc, D. A., Colosi, I. A., Costache, C., Ruospo, G., Berar, G., Gălbău, Ş. G., Ghilea, A. C., Botan, A., Pană, A. G., Neculicioiu, V. S., & Todea, D. A. (2023). An Overview of the Factors Involved in Biofilm Production by the Enterococcus Genus. *International journal of molecular sciences*, 24(14), 11577. <https://doi.org/10.3390/ijms241411577>
312. Schleifer, K.H., & Kilpper-Bälz, R. (1987). Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci, enterococci and lactococci: a review. *Systematic and Applied Microbiology*, 10, 1-19.
313. Schleifer, Karl & Kilper-Balz, Renate. (1984). Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34, 10.1099/00207713-34-1-31.

314. Schroeder, M., Brooks, B. D., & Brooks, A. E. (2017). The Complex relationship between virulence and antibiotic resistance. *Genes*, *8(1)*, 39. <https://doi.org/10.3390/genes8010039>
315. Schubert, M., Lindgreen, S., & Orlando, L. (2016). AdapterRemoval v2: rapid adapter trimming, identification, and read merging. *BMC research notes*, *9*, 88. <https://doi.org/10.1186/s13104-016-1900-2>
316. Schwarz, S., Shen, J., Kadlec, K., Wang, Y., Brenner Michael, G., Feßler, A. T., & Vester, B. (2016). Lincosamides, streptogramins, phenicols, and pleuromutilins: mode of action and mechanisms of resistance. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, *6(11)*, a027037. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a027037>
317. Sedláček I. Taxonomy of prokaryotes. 1st edition. 2007. Masaryk University, Brno, 270 pages, ISBN 8021042079.
318. Seelbinder, B., Chen, J., Brunke, S., Vazquez-Urbe, R., Santhaman, R., Meyer, A. C., de Oliveira Lino, F. S., Chan, K. F., Loos, D., Imamovic, L., Tsang, C. C., Lam, R. P., Sridhar, S., Kang, K., Hube, B., Woo, P. C., Sommer, M. O. A., & Panagiotou, G. (2020). Antibiotics create a shift from mutualism to competition in human gut communities with a longer-lasting impact on fungi than bacteria. *Microbiome*, *8(1)*, 133. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00899-6>
319. Serio, A., Paparella, A., Chaves-López, C., Corsetti, A., & Suzzi, G. (2007). *Enterococcus* populations in Pecorino Abruzzese cheese: biodiversity and safety aspects. *Journal of food protection*, *70(7)*, 1561–1568. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-70.7.1561>
320. Sherman J. M. (1938). The Enterococci and related streptococci. *Journal of bacteriology*, *35(2)*, 81–93. <https://doi.org/10.1128/jb.35.2.81-93.1938>
321. Shi, Y., Zhai, M., Li, J., & Li, B. (2020). Evaluation of safety and probiotic properties of a strain of *Enterococcus faecium* isolated from chicken bile. *Journal of food science and technology*, *57(2)*, 578–587. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04089-7>

322. Shin, J., Lee, S., Go, M. J., Lee, S. Y., Kim, S. C., Lee, C. H., & Cho, B. K. (2016). Analysis of the mouse gut microbiome using full-length 16S rRNA amplicon sequencing. *Scientific reports*, 6, 29681. <https://doi.org/10.1038/srep29681>
323. Signoretto, C., Burlacchini, G., Lleò, M. M., Pruzzo, C., Zampini, M., Pane, L., Franzini, G., & Canepari, P. (2004). Adhesion of *Enterococcus faecalis* in the nonculturable state to plankton is the main mechanism responsible for persistence of this bacterium in both lake and seawater. *Applied and environmental microbiology*, 70(11), 6892–6896. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.11.6892-6896.2004>
324. Silva, C. C. G., Silva, S. P. M., & Ribeiro, S. C. (2018). Application of bacteriocins and protective cultures in dairy food preservation. *Frontiers in microbiology*, 9, 594. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00594>.
325. Silva, Vanessa & Peixoto, Fernando & Igrejas, Gilberto & Medeiros, Carolina & Garcia, Patrícia & Carvalho, Isabel & Sousa, Margarida & Pereira, José & Rodrigues, Armindo & Poeta, Patrícia. (2018). First report on *vanA-Enterococcus faecalis* recovered from soils subjected to long-term livestock agricultural practices in Azores archipelago. *International Journal of Environmental Research*, 12. 10.1007/s41742-018-0068-0.
326. Singh, J. K., Devi, P. B., Reddy, G. B., Jaiswal, A. K., Kavitate, D., & Shetty, P. H. (2024). Biosynthesis, classification, properties, and applications of *Weissella* bacteriocins. *Frontiers in microbiology*, 15, 1406904. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1406904>
327. Singh, S. B., Carroll-Portillo, A., & Lin, H. C. (2023). *Desulfovibrio* in the gut: the enemy within?. *Microorganisms*, 11(7), 1772. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11071772>
328. Slyvka I, Tsisaryk O, Musii L et al (2022) Identification and investigation of properties of strains *Enterococcus* spp. isolated from artisanal Carpathian cheese. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 39, 102259. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102259>

329. Smolinska, S., Popescu, F. D., & Zemelka-Wiacek, M. (2025). A review of the influence of prebiotics, probiotics, synbiotics, and postbiotics on the human gut microbiome and intestinal integrity. *Journal of clinical medicine*, *14*(11), 3673. <https://doi.org/10.3390/jcm14113673>
330. Soltani, S., Hammami, R., Cotter, P. D., Rebuffat, S., Said, L. B., Gaudreau, H., Bédard, F., Biron, E., Drider, D., & Fliss, I. (2021). Bacteriocins as a new generation of antimicrobials: toxicity aspects and regulations. *FEMS microbiology reviews*, *45*(1), fuaa039. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa039>
331. Sugrue, I., Ross, R. P., & Hill, C. (2024). Bacteriocin diversity, function, discovery and application as antimicrobials. *Nature reviews. Microbiology*, *22*(9), 556–571. <https://doi.org/10.1038/s41579-024-01045-x>
332. Sun, D., Jeannot, K., Xiao, Y., & Knapp, C. W. (2019). Editorial: horizontal gene transfer mediated bacterial antibiotic resistance. *Frontiers in microbiology*, *10*, 1933. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01933>
333. Tadesse, B. T., Svetlicic, E., Zhao, S., Berhane, N., Jers, C., Solem, C., & Mijakovic, I. (2024). Bad to the bone? - Genomic analysis of *Enterococcus* isolates from diverse environments reveals that most are safe and display potential as food fermentation microorganisms. *Microbiological research*, *283*, 127702. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2024.127702>
334. Tatusov, R. L., Galperin, M. Y., Natale, D. A., & Koonin, E. V. (2000). The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic acids research*, *28*(1), 33–36. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.33>
335. Terzić-Vidojević A, Veljović K, Popović N et al (2021) *Enterococci* from Raw-Milk Cheeses: Current Knowledge on Safety, Technological, and Probiotic Concerns. *Foods (Basel)* *10*(11):2753. <https://doi.org/10.3390/foods10112753>
336. Thiercelin, E.; Jouhaud, L. (1903). Reproduction de l'entérocoque; taches centrales; granulations peripheriques et microblastes. *Comptes Rendus Seances Soc. Biol. Paris*, *55*, 686–688

337. Thurlow, L. R., Thomas, V. C., Fleming, S. D., & Hancock, L. E. (2009). *Enterococcus faecalis* capsular polysaccharide serotypes C and D and their contributions to host innate immune evasion. *Infection and immunity*, *77*(12), 5551–5557. <https://doi.org/10.1128/IAI.00576-09>
338. Todaro, Massimo & Palmeri, Marisa & Settanni, Luca & Scatassa, Maria & Mazza, Francesca & Bonanno, Adriana & Di Grigoli, Antonino. (2017). Effect of refrigerated storage on microbiological, chemical and sensory characteristics of a ewes' raw milk stretched cheese. *Food Packaging and Shelf Life*, *11*. 67-73. [10.1016/j.fpsl.2017.01.005](https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2017.01.005).
339. Todorov, S. D., Popov, I., Weeks, R., & Chikindas, M. L. (2022). Use of Bacteriocins and Bacteriocinogenic Beneficial Organisms in Food Products: Benefits, Challenges, Concerns. *Foods (Basel, Switzerland)*, *11*(19), 3145. <https://doi.org/10.3390/foods11193145>
340. Torres-Llanez, M. J., González-Córdova, A. F., Hernandez-Mendoza, A., Garcia, H. S., & Vallejo-Cordoba, B. (2011). Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in Mexican Fresco cheese. *Journal of dairy science*, *94*(8), 3794–3800. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4237>
341. Tsanasidou, C., Asimakoula, S., Sameli, N., Fanitsios, C., Vandera, E., Bosnea, L., Koukkou, A. I., & Samelis, J. (2021). Safety Evaluation, Biogenic Amine Formation, and Enzymatic Activity Profiles of Autochthonous Enterocin-Producing Greek Cheese Isolates of the *Enterococcus faecium/durans* Group. *Microorganisms*, *9*(4), 777. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040777>
342. Ulloa, F., Penati, M., Monistero, V., Bronzo, V., Moroni, P., Salgado, M., & Addis, M. F. (2025). *Enterococcus* species identified by MALDI-TOF MS in milk from dairy cow mastitis cases and herd surveys. *Veterinary Research Communications*, *49*(5), 261.
343. Umair, M., Jabbar, S., Zhaoxin, L., Jianhao, Z., Abid, M., Khan, K. R., Korma, S. A., Alghamdi, M. A., El-Saadony, M. T., Abd El-Hack, M. E., Cacciotti, I., AbuQamar, S. F., El-Tarabily, K. A., & Zhao, L. (2022). Probiotic-

- Based Bacteriocin: Immunity Supplementation Against Viruses. An Updated Review. *Frontiers in microbiology*, 13, 876058. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.876058>
344. Urban, M., Cuzick, A., Seager, J., Wood, V., Rutherford, K., Venkatesh, S. Y., Sahu, J., Iyer, S. V., Khamari, L., De Silva, N., Martinez, M. C., Pedro, H., Yates, A. D., & Hammond-Kosack, K. E. (2022). PHI-base in 2022: a multi-species phenotype database for Pathogen-Host Interactions. *Nucleic acids research*, 50(D1), D837–D847. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1037>
345. van Duijkeren, E., Greko, C., Pringle, M., Baptiste, K. E., Catry, B., Jukes, H., Moreno, M. A., Pomba, M. C., Pyörälä, S., Rantala, M., Ružauskas, M., Sanders, P., Teale, C., Threlfall, E. J., Torren-Edo, J., & Törneke, K. (2014). Pleuromutilins: use in food-producing animals in the European Union, development of resistance and impact on human and animal health. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 69(8), 2022–2031. <https://doi.org/10.1093/jac/dku123>
346. van Heel, A. J., de Jong, A., Song, C., Viel, J. H., Kok, J., & Kuipers, O. P. (2018). BAGEL4: a user-friendly web server to thoroughly mine RiPPs and bacteriocins. *Nucleic acids research*, 46(W1), W278–W281. <https://doi.org/10.1093/nar/gky383>
347. Van Tyne, D., & Gilmore, M. S. (2014). Friend turned foe: evolution of enterococcal virulence and antibiotic resistance. *Annual review of microbiology*, 68, 337–356. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091213-113003>
348. Vandera, E., Kakouri, A., Koukkou, A. I., & Samelis, J. (2019). Major ecological shifts within the dominant nonstarter lactic acid bacteria in mature Greek Graviera cheese as affected by the starter culture type. *International journal of food microbiology*, 290, 15–26. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.09.014>
349. Vandera, E., Lianou, A., Kakouri, A., Feng, J., Koukkou, A. I., & Samelis, J. (2017). Enhanced control of *Listeria monocytogenes* by *Enterococcus faecium* KE82, a multiple enterocin-producing strain, in different milk environments.

- Journal of food protection*, 80(1), 74–85. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-082>
350. Velázquez-Suárez, C., Cebrián, R., Gasca-Capote, C., Sorlózano-Puerto, A., Gutiérrez-Fernández, J., Martínez-Bueno, M., Maqueda, M., & Valdivia, E. (2021). Antimicrobial Activity of the Circular Bacteriocin AS-48 against Clinical Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 10(8), 925. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10080925>
351. Vlízlo, V.V., Fedoruk, R.S., Ratych, I.B. (2012). Laboratory research methods in biology, animal husbandry and veterinary medicine: a handbook. Lviv: Spolom. 764.
352. Wang, N., Gao, J., Liu, Y., Wang, Q., Zhuang, X., & Zhuang, G. (2021). Realizing the role of N-acyl-homoserine lactone-mediated quorum sensing in nitrification and denitrification: a review. *Chemosphere*, 274, 129970. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129970>
353. Wang, X., Yang, Y., & Huycke, M. M. (2020). Risks associated with enterococci as probiotics. *Food research international (Ottawa, Ont.)*, 129, 108788. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108788>
354. Wei, Y., Palacios Araya, D., & Palmer, K. L. (2024). *Enterococcus faecium*: evolution, adaptation, pathogenesis and emerging therapeutics. *Nature reviews. Microbiology*, 22(11), 705–721. <https://doi.org/10.1038/s41579-024-01058-6>
355. Whitman, R. L., Shively, D. A., Pawlik, H., Nevers, M. B., & Byappanahalli, M. N. (2003). Occurrence of *Escherichia coli* and enterococci in *Cladophora (Chlorophyta)* in nearshore water and beach sand of Lake Michigan. *Applied and environmental microbiology*, 69(8), 4714–4719. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.4714-4719.2003>
356. WHO. (2019). World Health Organization Model List of Essential Medicines, 21st ed.; World Health Organization: Geneva, Switzerland.

357. Wick, R. R., Judd, L. M., & Holt, K. E. (2019). Performance of neural network basecalling tools for Oxford Nanopore sequencing. *Genome biology*, *20(1)*, 129. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1727-y>
358. Wishart, D. S., Han, S., Saha, S., Oler, E., Peters, H., Grant, J. R., Stothard, P., & Gautam, V. (2023). PHASTEST: faster than PHASTER, better than PHAST. *Nucleic acids research*, *51(W1)*, W443–W450. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad382>
359. Yamamoto, N., Shoji, M., Hoshigami, H., Watanabe, K., Watanabe, K., Takatsuzu, T., Yasuda, S., Igoshi, K., & Kinoshita, H. (2019). Antioxidant capacity of soymilk yogurt and exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Bioscience of microbiota, food and health*, *38(3)*, 97–104. <https://doi.org/10.12938/bmfh.18-017>
360. Yang, Y., Yang, X., Zhou, H., Niu, Y., Li, J., Fu, X., Wang, S., Xue, B., Li, C., Zhao, C., Zhang, X., Shen, Z., Wang, J., & Qiu, Z. (2022). Bisphenols Promote the Pheromone-Responsive Plasmid-Mediated Conjugative Transfer of Antibiotic Resistance Genes in *Enterococcus faecalis*. *Environmental science & technology*, *56(24)*, 17653–17662. <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c05349>
361. Yerlikaya, O., & Akbulut, N. (2019). Potential use of probiotic *Enterococcus faecium* and *Enterococcus durans* strains in Izmir Tulum cheese as adjunct culture. *Journal of food science and technology*, *56(4)*, 2175–2185. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03699-5>
362. Yerlikaya, Oktay, Akpınar, Asli, Saygılı, Derya. (2020). Analysis of some physicochemical, rheological, sensorial properties, and probiotic viability of fermented milks containing *Enterococcus faecium* and *Enterococcus durans* strains. *Journal of Food Processing and Preservation*, *44*. 10.1111/jfpp.14553.
363. Yu, D., Pei, Z., Chen, Y., Wang, H., Xiao, Y., Zhang, H., Chen, W., & Lu, W. (2023). *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* as widespread bacteriocin gene clusters carrier stands out among the *Bifidobacterium*. *Applied and environmental microbiology*, *89(9)*, e0097923. <https://doi.org/10.1128/aem.00979-23>

364. Zeng, X., & Hu, H. (2023). Potential roles of acyl homoserine lactones (AHLs) in nitrifying bacteria survival under certain adverse circumstances. *Scientific reports*, *13*(1), 705. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-23123-x>
365. Zhang, D., Zhang, J., Kalimuthu, S., Liu, J., Song, Z. M., He, B. B., Cai, P., Zhong, Z., Feng, C., Neelakantan, P., & Li, Y. X. (2023). A systematically biosynthetic investigation of lactic acid bacteria reveals diverse antagonistic bacteriocins that potentially shape the human microbiome. *Microbiome*, *11*(1), 91. <https://doi.org/10.1186/s40168-023-01540-y>
366. Zhang, F., Aschenbrenner, D., Yoo, J. Y., & Zuo, T. (2022). The gut mycobiome in health, disease, and clinical applications in association with the gut bacterial microbiome assembly. *The Lancet. Microbe*, *3*(12), e969–e983. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(22\)00203-8](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(22)00203-8)
367. Zhao, B., Osbelt, L., Lesker, T. R., Wende, M., Galvez, E. J. C., Hönicke, L., Bublitz, A., Greweling-Pils, M. C., Grassl, G. A., Neumann-Schaal, M., & Strowig, T. (2023). *Helicobacter spp.* are prevalent in wild mice and protect from lethal *Citrobacter rodentium* infection in the absence of adaptive immunity. *Cell reports*, *42*(6), 112549. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112549>
368. Zhong, R., Zhou, Z., Liu, H., Zhong, Z., & Peng, G. (2021). Antimicrobial resistance and virulence factor gene profiles of *Enterococcus spp.* isolated from giant panda oral cavities. *Journal of Veterinary Research*, *65*(2), 147.
369. Zhu, L., Zeng, J., & Wang, J. (2022). Structural Basis of the Immunity Mechanisms of Pediocin-like Bacteriocins. *Applied and environmental microbiology*, *88*(13), e0048122. <https://doi.org/10.1128/aem.00481-22>
370. Zhu, Y., Augustijn, H. E., Pascal Andreu, V., Draisma, A., van Wezel, G. P., Dodd, D., Fischbach, M. A., & Medema, M. H. (2025). gutSMASH 2.0: extended identification of primary metabolic gene clusters from the human gut microbiota. *Journal of molecular biology*, 169567. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2025.169567>

371. Zhu, Y., Li, T., Din, A. U., Hassan, A., Wang, Y., & Wang, G. (2019). Beneficial effects of *Enterococcus faecalis* in hypercholesterolemic mice on cholesterol transportation and gut microbiota. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(7), 3181–3191. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09681-7>
372. Zoumpopoulou, Georgia & Papadimitriou, Konstantinos & Alexandraki, Voula & Mavrogonatou, Eleni & Alexopoulou, Katerina & Anastasiou, Rania & Georgalaki, Marina & Kletsas, Dimitris & Tsakalidou, Effie & Giaouris, Efstathios. (2020). The microbiota of Kalathaki and Melichloro Greek artisanal cheeses comprises functional lactic acid bacteria. *LWT*, 130. 109570. [10.1016/j.lwt.2020.109570](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109570).
373. Кукуян С., Мушинська В., Громико О., Тістечок С., Штапенко О., Сирватка В. (2024,18-20 квітня).). Пробиотична дія *Enterococcus faecium* SB-12 на організм мишей. Збірник тез XX Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ в біології», присвяченої 90-річчю від дня народження професора Ореста Демківа, м. Львів, Україна, ст. 150-152.
374. Кукуян С., Мушинська В., Громико О., Тістечок С., Штапенко О., Сирватка В. (2025, 14-15 травня). Порівняльний аналіз геномів штаму *Enterococcus* sp. SB12 та штамів *Enterococcus faecium*, виділених з молочнокислих продуктів. Матеріали міжнародної наукової конференції «Актуальні питання біотехнології, екології та природокористування» м. Харків, Україна, ст. 72-73.
375. Мушинська В. С., Сирватка В. Я., Штапенко О. В. (2026). Вплив довготривалого введення штаму *Enterococcus* sp. SB12 на показники оксидативного стресу мишей. *Біологія тварин*, 28(1), 56-61. <https://doi.org/10.15407/animbiol28.01.056>
376. Мушинська В., Роман І., Тістечок С., Громико О., Цісарик О., Сливка І., Штапенко О., Сирватка В. Аналіз послідовності чернетки геному ізоляту *Enterococcus* sp. SB12. (2023, 18-19 травня). Тези доповідей XXI

Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених, присвяченої 100-річчю від дня народження доктора біологічних наук, професора Василя Юхимовича Шавкуна: «Біологія тварин», Львів, Україна, ст. 69.

377. Мушинська В., Тістечок С., Роман І., Громико О., Штапенко О., Сирватка В. (2024, 19-20 вересня). Вплив Штаму *Enterococcus* sp. SB12 на мікробіом кишківника мишей. Тези доповідей XXII Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених, присвяченої 75-річчю від дня народження доктора ветеринарних наук, професора, члена-кореспондента НААН Ростислава ФЕДОРУКА (11.08.1949 — 21.06.2023): «Біологія тварин», м. Львів, Україна, ст. 159.

## ДОДАТОК А

### Штами інших мікроорганізмів, використаних в роботі

Штам	Характеристика	Джерело
<i>Bacillus subtilis</i> АТТС 31324	Типовий штам	Колекція культур мікроорганізмів - продуцентів антибіотиків (ККМПА)
<i>Staphylococcus aureus</i> АТСС 25923	Типовий штам	ККМПА
<i>Escherichia coli</i> АТТС 25922	Типовий штам	ККМПА
<i>E. coli</i> GB2005	Похідний штаму <i>E. coli</i> DH10В в якого делетовані гени <i>fhuA</i> , <i>ubcS</i> , <i>recE</i> Т для зменшення спонтанних рекомбінацій, збільшення стабільності плазмід і стійкості до певних вірусів.	German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSM)
<i>Mycobacterium smegmatis</i> MC <sup>2</sup> 155	Дикий тип	DSM
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Типовий штам	DSM
<i>Candida albicans</i> АТТС 885-653	Типовий штам	ККМПА

## ДОДАТОК Б

### Склад поживних середовищ, використаних в роботі

**MRS:** використовували готове середовище компанії HiMedia, готували згідно рекомендацій виробника.

**TSB:** використовували готове середовище компанії HiMedia, готували згідно рекомендацій виробника.

**VHI:** використовували готове середовище компанії HiMedia, готували згідно рекомендацій виробника.

**LB/LA:** триптон (Sigma-Aldrich) – 10 г/л; дріжджовий екстракт (Sigma-Aldrich, США) – 5 г/л; NaCl (СфераСім, Україна) – 5 г/л. LA готували, додавши 20 г/л агару (Conda, Іспанія).

**DAВ:** пептон – 5 г/л (Sigma-Aldrich, США), дріжджовий екстракт (Sigma-Aldrich, США) – 3 г/л, декстроза (глюкоза) – 1 г/л СфераСім, Україна), бромокрезоловий пурпуровий – 0,020 г/л (Sigma-Aldrich, США), агар – 15 г/л (Conda, Іспанія). Доводили рН до 6,5.

**Сабуро:** використовували готове середовище компанії Condalab, готували згідно рекомендацій виробника.

## ДОДАТОК В

### Екстракти метаболітів *Enterococcus* sp. SB12

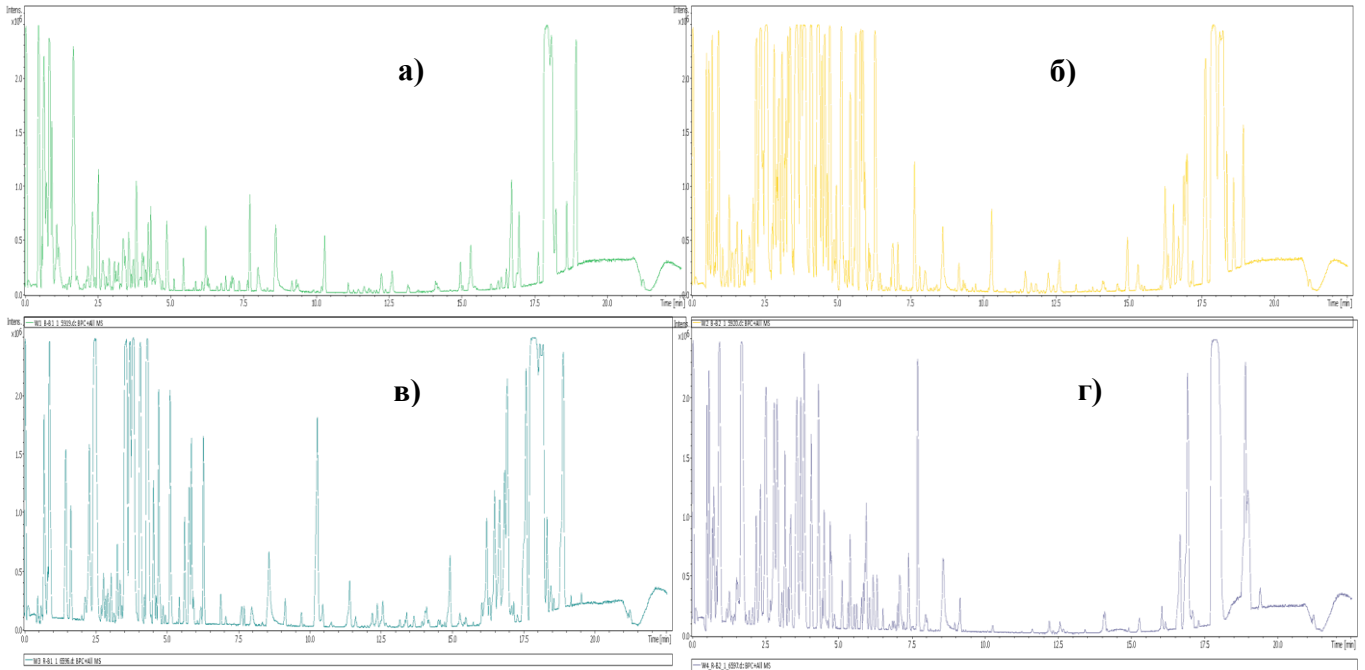
Екстракт	Тип	Середовище	Розчинник	Час культивування <i>Enterococcus</i> sp. SB12
1	з біомаси	TSB	метанол	24 години
2	з культуральної рідини	TSB	етилацетат	24 години
3	з культуральної рідини	TSB	хлороформ	24 години
4	з культуральної рідини	TSB	бутанол	24 години
5	з біомаси	BHI	метанол	24 години
6	з культуральної рідини	BHI	етилацетат	24 години
7	з культуральної рідини	BHI	хлороформ	24 години
8	з культуральної рідини	BHI	бутанол	24 години
9	з біомаси	TSB	метанол	48 годин
10	з культуральної рідини	TSB	етилацетат	48 годин
11	з культуральної рідини	TSB	хлороформ	48 годин
12	з культуральної рідини	TSB	бутанол	48 годин
13	з біомаси	BHI	метанол	48 годин

14	з культуральної рідини	BHI	етилацетат	48 годин
15	з культуральної рідини	BHI	хлороформ	48 годин
16	з культуральної рідини	BHI	бутанол	48 годин
17	з біомаси	MRS	метанол	24 години
18	з культуральної рідини	MRS	етилацетат	24 години
19	з культуральної рідини	MRS	хлороформ	24 години
20	з культуральної рідини	MRS	бутанол	24 години
21	з біомаси	MRS	метанол	48 годин
22	з культуральної рідини	MRS	етилацетат	48 годин
23	з культуральної рідини	MRS	хлороформ	48 годин
24	з культуральної рідини	MRS	бутанол	48 годин

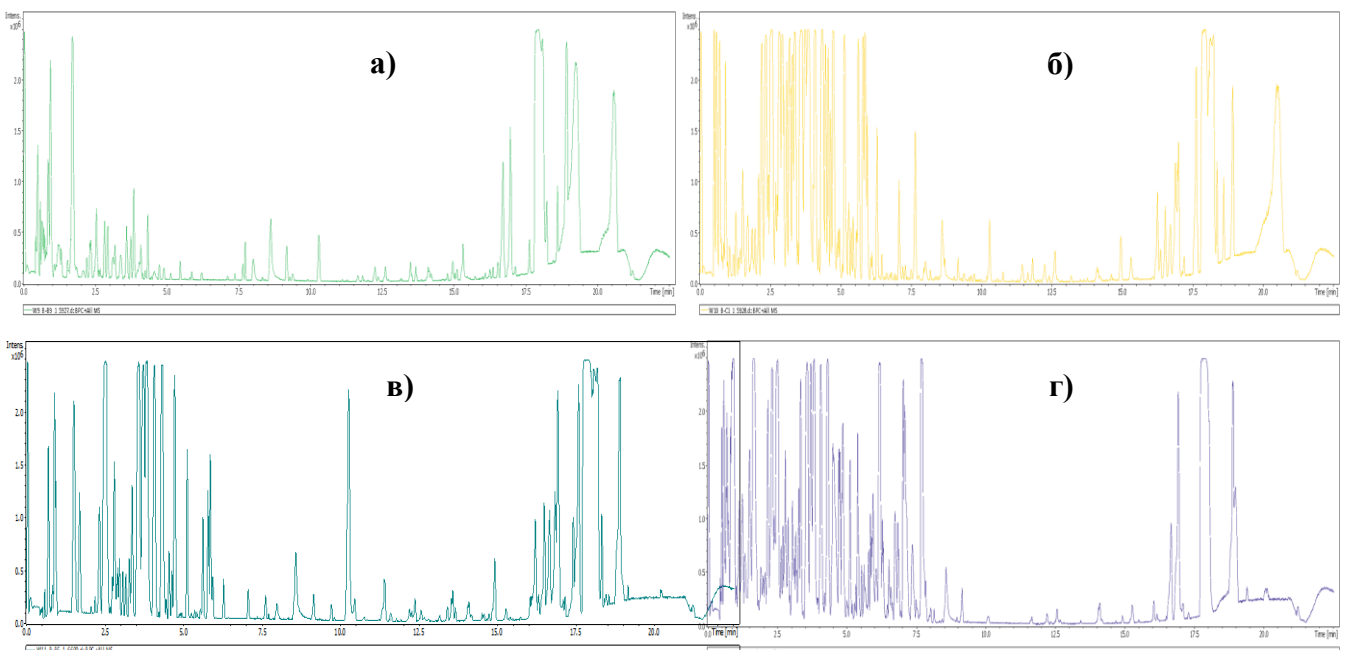
## ДОДАТОК Г

### Хроматограми екстрактів вторинних метаболітів *Enterococcus* sp. SB12

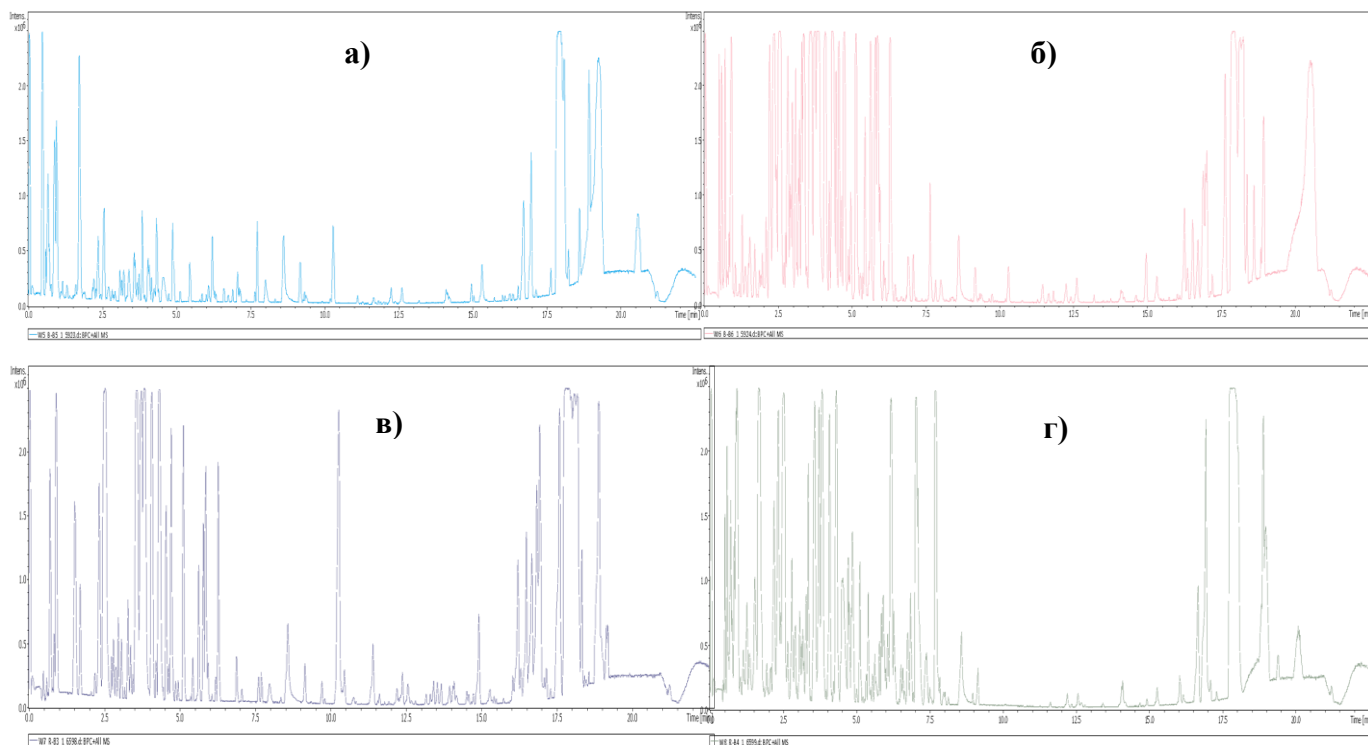
**Рис.1.** Екстракти штаму SB12 на 24 годину культивування в середовищі TSB: (а) біомаса+метанол, (б) культуральна рідина+етилацетат, (в), культуральна рідина+хлороформ, (г) культуральна рідина+бутанол.



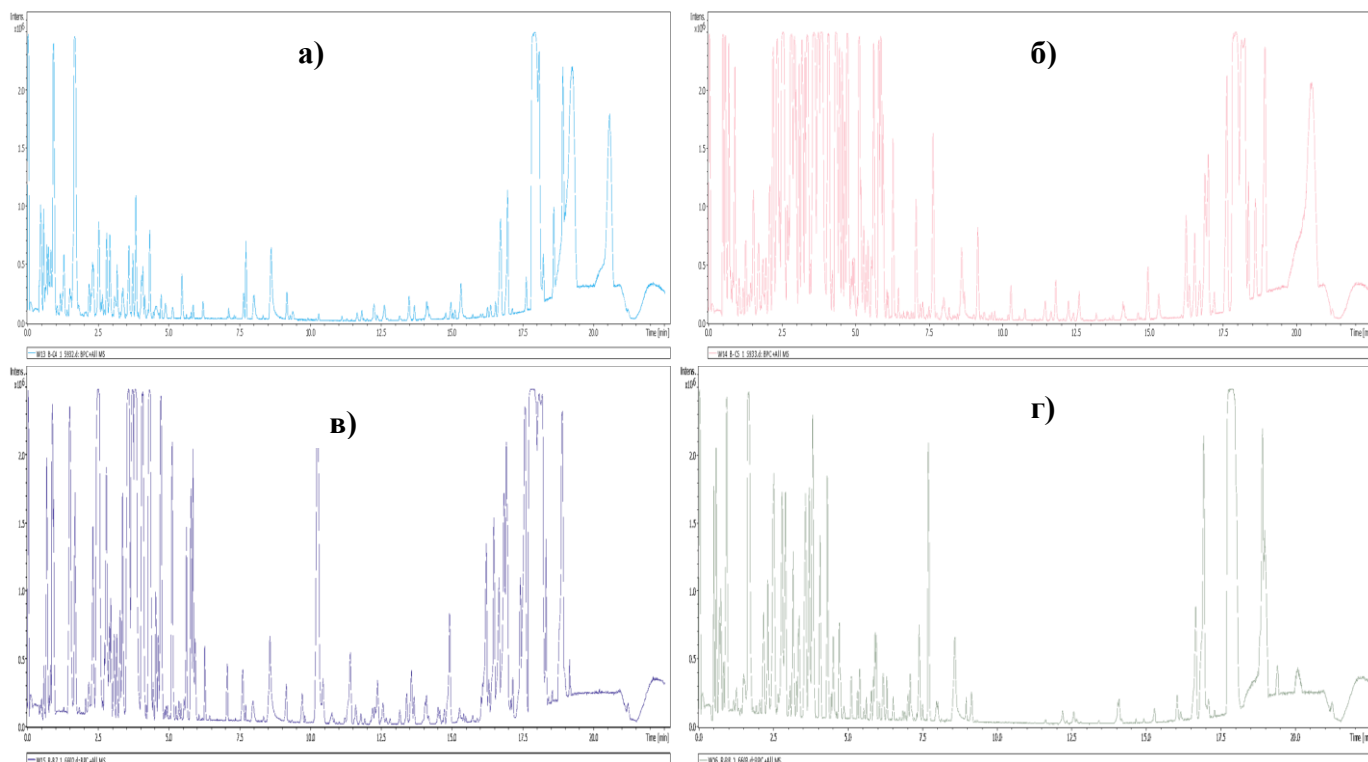
**Рис.2.** Екстракти штаму SB12 на 48 годину культивування в середовищі TSB: (а) біомаса+метанол, (б) культуральна рідина+етилацетат, (в), культуральна рідина+хлороформ, (г) культуральна рідина+бутанол.



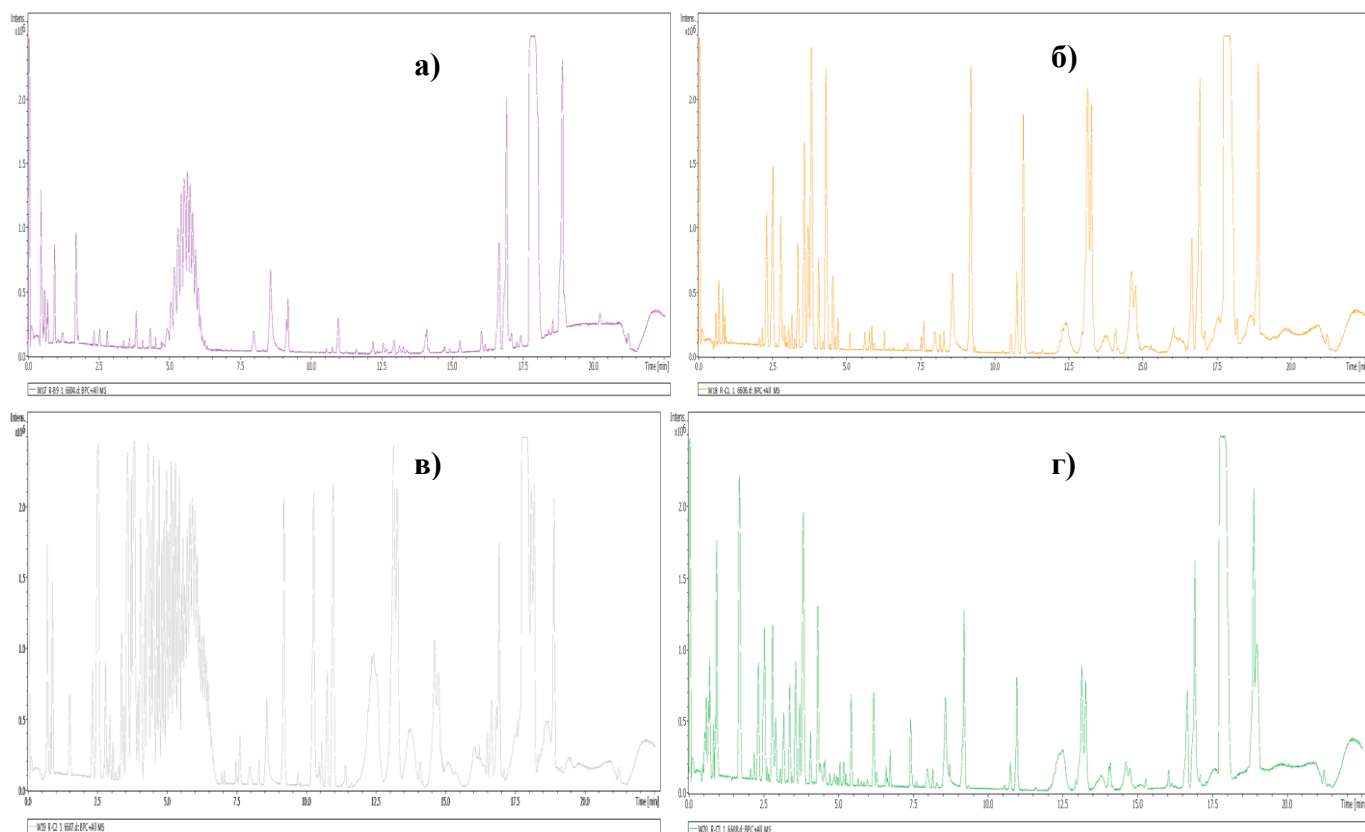
**Рис.3.** Екстракти штаму SB12 на 24 годину культивування в середовищі ВНІ: (а) біомаса+метанол, (б) культуральна рідина+етилацетат, (в), культуральна рідина+хлороформ, (г) культуральна рідина+бутанол.



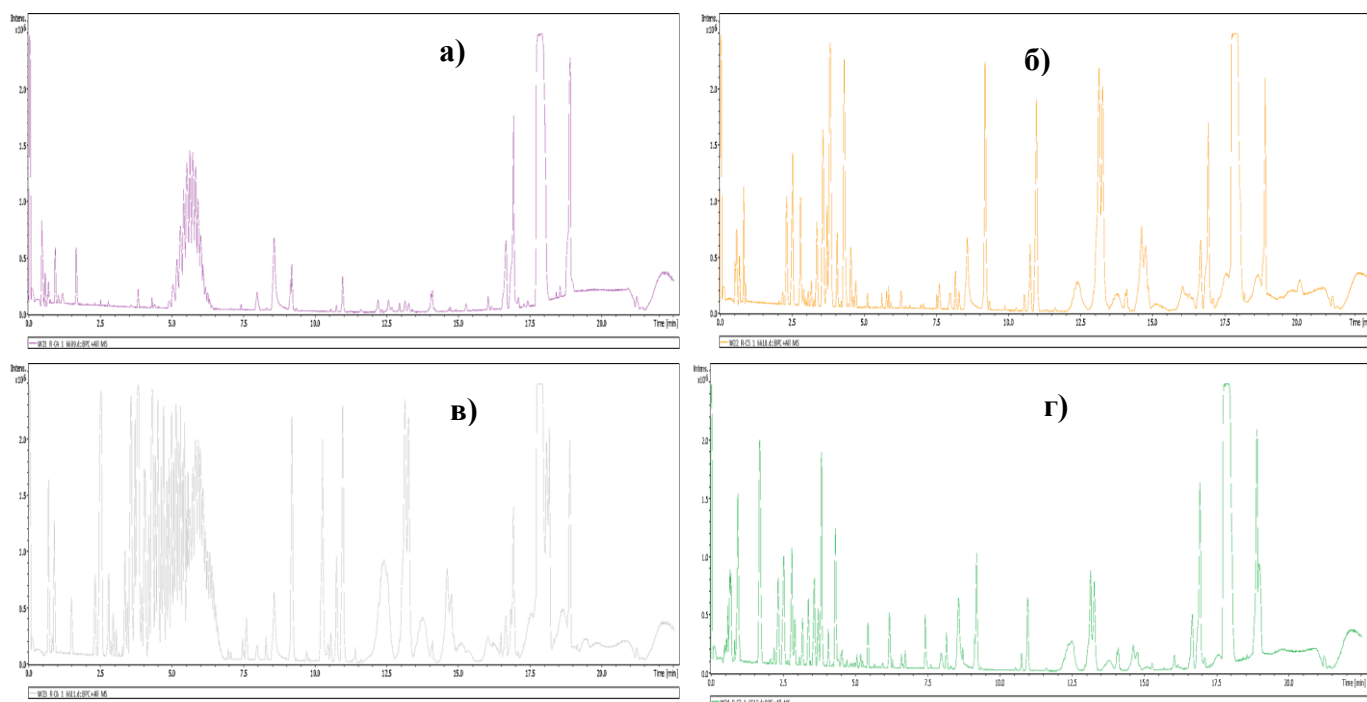
**Рис.4.** Екстракти штаму SB12 на 48 годину культивування в середовищі ВНІ: (а) біомаса+метанол, (б) культуральна рідина+етилацетат, (в), культуральна рідина+хлороформ, (г) культуральна рідина+бутанол.



**Рис.5.** Екстракти штаму SB12 на 24 години культивування в середовищі MRS: (а) біомаса+метанол, (б) культуральна рідина+етилацетат, (в), культуральна рідина+хлороформ, (г) культуральна рідина+бутанол.



**Рис.6.** Екстракти штаму SB12 на 48 години культивування в середовищі MRS: (а) біомаса+метанол, (б) культуральна рідина+етилацетат, (в), культуральна рідина+хлороформ, (г) культуральна рідина+бутанол.





**Львівський національний університет  
імені Івана Франка**

Адреса: вул. Університетська 1, м. Львів, 79000, Україна  
Телефон: (+38 032) 274-01-80, 239-41-86  
E-mail: ami@lnu.edu.ua Сайт: ami.lnu.edu.ua

**БІОЛОГІЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ**

Адреса: вул. Михайла Грушевського, 4, м. Львів, 79005, Україна  
Телефон: (+38 032) 239-41-53  
E-mail: biolog@lnu.edu.ua  
Сайт: www.bioweb.lnu.edu.ua

№ 22-а Від 27.02.2019

**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ  
результатів дисертаційної роботи «Геномна та функціональна характеристика  
пробіотичного потенціалу штаму *Enterococcus* sp. SB12»**

Підтверджуємо, що результати дисертаційної роботи Мушинської Вікторії Станіславівни на тему «Геномна та функціональна характеристика пробіотичного потенціалу штаму *Enterococcus* sp. SB12» на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія», впроваджено в навчальний процес кафедри генетики та біотехнології Львівського національного університету імені Івана Франка.

Матеріали дисертаційного дослідження використовуються під час викладання навчальних дисциплін «Великий практикум» та «Генетика і селекція біотехнологічних продуцентів» що викладаються в межах ОПП «Біотехнології та біоінженерія» першого (бакалаврського) рівня вищої освіти для здобувачів спеціальності G21 Біотехнології та біоінженерія

У навчальний процес впроваджено методичні підходи та результати досліджень щодо:

- оцінки генетичної безпеки штамів бактерій шляхом аналізу генів вірулентності та антибіотикорезистентності;
- аналізу продукції бактеріоцинів, вітамінів та інших біологічно активних сполук мікроорганізмами;

Впровадження результатів дисертаційної роботи сприяє поглибленню знань студентів у галузі сучасної біотехнології та формуванню практичних навичок дослідження та оцінки пробіотичних мікроорганізмів.

**Завідувач кафедри генетики та біотехнології,  
професор**

**Декан біологічного факультету, доцент**



**Віктор ФЕДОРЕНКО**

**Ігор ХАМАР**