

RAPORT STIINTIFIC SI TEHNIC

REZUMAT

ETAPA III

IDENTIFICAREA TULPINILOR DE BACTERII LACTICE SELECȚIONATE ȘI CARACTERIZAREA METABOLIȚILOR DE INTERES

În decursul acestei etape, folosind metodele cromatografice de testare (**Gel Permeation Chromatography = GPC**), au fost selectate 12 tulpini **producătoare de exopolizaharide (EPS)**: P37, P63, P75, P93, P109, P112, P113, P116, P124, P127, P133, P138. De la nouă dintre aceste tulpini au putut fi izolate EPS din mediul de cultură prin precipitări cu TCA și acetonă. În cazul celorlalte 3 tulpini, cantitatea de EPS produse este, probabil foarte mică, sau acestea co-precipită cu proteinele la adăugarea TCA și nu mai pot fi detectate la precipitarea cu acetonă.

Izolarea exopolizaharidelor s-a realizat după metoda propusă de către De Vuyst și Degeest (1999). Aceasta presupune îndepărtarea proteinelor din mediul de cultură prin precipitarea acestora cu acid tricloracetic (TCA), urmată de precipitarea polizaharidelor cu acetonă. Pentru cultivarea bacteriilor producătoare de EPS a fost folosit mediul MRS filtrat. Polizaharidele obținute au fost dizolvate în apă ultrapură și dializate sau uscate și cântărite, pentru determinarea cantitativă. Cele mai mari cantități, de peste 10 g/l, au fost obținute pentru tulpinile P109, P112 și P127, izolate din gogoșari, morcovi, respectiv varză albă, toate proaspete.

Pentru determinarea masei moleculare a EPS izolate și purificate prin dializă, a fost folosită aceeași tehnică cromatografică bazată pe GPC, descrisă mai sus. Comparând profilele de eluție ale probelor cu cele ale standardelor cu masă moleculară cunoscută, se poate face o estimare a masei moleculare a EPS testate. Toate EPS izolate în acest studiu au masa moleculară mai mare decât 1400 KDa (fiind eluate înainte de dextranul cu masa de 1400 KDa).

Determinarea compoziției glucidice a fost făcută folosind exopolizaharidele purificate prin dializă, care au fost hidrolizate cu HCl 8N timp de 3 ore la 100°C (Vaningelgem și colab., 2004), iar apoi au fost analizate cu ajutorul tehnicii de cromatografie în strat subțire (TLC= Thin-Layer Chromatography), folosind un sistem semiautomat CAMAG (Muttenez, Germany). Eluția s-a realizat cu un amestec 1-butanol/acid acetic/apă, 6/1/2 (v/v). Benzile obținute au fost vizualizate cu acid p-aminobenzoic. Ca standarde au fost folosite următoarele glucide: glucoza, riboza, xiloza, arabinoza, fructoza, manoza, galactoza, ramnoza (Fluka, Sigma-Adrich), glucozamina și galactozamina (Calbiochem, Inc. San Diego, CA), în concentrație de 1μg/ml.

În urma analizei TLC, s-a observat prezența unei benzi foarte intense corespunzând galactozei; se mai pot observa unele benzi mai puțin intense, corespunzătoare din punct de vedere al distanței de migrare cu riboza sau xiloza, dar acestea ar putea fi și resturi de oligozaharide, rezultate în urma unei hidrolize incomplete. Pentru a avea informații mai exacte privind compoziția glucidică a EPS, este nevoie să se folosească și alte tehnici de analiză, cum ar fi cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC). De asemenea, pentru a elimina benzile interferente, s-ar putea încerca o hidroliză a EPS pentru o perioadă mai îndelungată sau în condiții mai drastice.

Pentru testarea potențialului prebiotic, au fost selectate trei tulpini, P109, P127 și tulpina 406 (selectată în etapa anterioară), care produc cantități mari de EPS. Polimerii purificați și liofilizați au fost dizolvați în apă pură (10 g/l). A fost testată rezistența EPS la pH scăzut (pH 2.0, ajustat cu HCl), la autoclavare și în urma tratamentului cu pepsină (pH 2.0), respectiv pancreatină (pH 7.0). Probele prelevate au fost supuse tehnicii GPC. EPS nu au fost degradate

după expunerea la pH scăzut sau la acțiunea unor enzime digestive. Mai mult, acestea au fost metabolizate ușor de alte bacterii lactice cu efect antibacterian.

A fost continuată activitatea de evaluare a **proprietăților antifungice** ale unor izolate de bacterii lactice și s-a stabilit spectrul de acțiune pentru 12 dintre acestea. S-a evidențiat că unele tulpini au o foarte bună acțiune inhibitorie față de fungi micotoxigeni (*Aspergillus flavus*, *Fusarium graminearum* și *F. culmorum*). Pentru determinarea mecanismului inhibitor a fost determinată, în principal, producerea de acizi organici: acid lactic, acid acetic, acid fenilactic și acid hidroxifenilactic (prin HPLC). Datele obținute sunt în concordanță cu cele din literatura de specialitate, sugerând că activitatea antifungică a tulpinilor bacteriene testate se datorează, în primul rând, producerii de acizi organici. Excepție face tulpina P43 care, deși sintetizează cantități reduse de acizi organici, prezintă totuși o bună acțiune antifungică față de anumite tulpini de interes, ceea ce înseamnă că efectul inhibitor se datorează altor mecanisme (cel mai probabil producerea de bacteriocine sau alți compuși peptidici inhibitori).

O atenție specială a fost acordată acțiunii bacteriilor lactice selectate asupra unor tulpini de *Aspergillus* (*A. flavus* și *A. ochraceus*) izolate din diferite surse (pâine, semințe, cereale), potențial producătoare de aflatoxine, respectiv ochratoxină și de *Fusarium* (*F. culmorum*, *F. graminearum*) cunoscute a fi producătoare de deoxinivalenol.

Analizele efectuate ilustrează o bună acțiune inhibitorie față de noile tulpini fungice testate. În plus, prin examinarea la microscopul optic a interacțiunilor antagoniste manifestate de tulpinile de bacterii lactice P35 și P58 (tulpini care au manifestat un spectru de acțiune destul de larg) față de fungii din genul *Aspergillus* au fost observate unele alterări ale hifelor miceliene precum: fragmentări, liza pereților celulari și scurgerea conținutului citoplasmatic, răsucirea terminațiilor de creștere miceliană pentru evitarea contactului cu tulpinile antagoniste.

Un alt aspect examinat în cazul unora dintre tulpinile bacteriene selectate a fost producerea de fitază, enzimă importantă în degradarea fitatului. Fitatul este abundent în cereale, legume, uleiuri, semințe etc. unde reprezintă între 50% și 80% din totalul compușilor cu fosfor. Fitatul este greu degradabil de către animale datorită nivelului insuficient de fitaze de la nivelul intestinului. De asemenea, s-a demonstrat că acidul fitic este un antinutrient, el formând complexe cu proteine, aminoacizi și o serie de ioni (de calciu, magneziu, fier și zinc) scăzând în acest fel absorbția lor la nivel intestinal (Haros și colab., 2008; Sumengen și colab., 2012). De aceea, detectarea capacității de biosinteză a fitazei de către tulpini de bacterii lactice ar putea constitui un avantaj în ceea ce privește utilizarea acestora în diferite tehnologii.

Pentru determinarea activității fitazice a fost utilizată metoda descrisă de Sumengen și colab. (2013), primele testări evidențiind activitate fitazică (la un nivel scăzut comparativ cu datele din literatura de specialitate) la tulpinile Lpl, P58 și, posibil la P61. Datele obținute sunt încurajatoare, urmând ca în etapa următoare să fie optimizată metoda de dozare a acestor enzime.

În cadrul experimentelor din această etapă a fost determinată și capacitatea bacteriilor de a îndepărta deoxinivalenolul (DON) din mediul de cultură (evaluarea fiind făcută prin HPLC). Trei dintre tulpinile testate, P8, P58 și P61, au evidențiat capacitatea de a reduce nivelul DON din supernatant prin legare la suprafața celulară sau, în cazul tulpinii P58, posibil și prin alte mecanisme (de exemplu degradare).

În ceea ce privește compușii responsabili de **activitatea antibacteriană** a tulpinilor selectate, în această etapă au fost studiate: apa oxigenată și bacteriocinele.

Unul dintre metaboliții cu activitate antimicrobiană produs de bacteriile lactice este peroxidul de hidrogen (H₂O₂). Peroxidul de hidrogen acționează asupra celulelor sensibile prin oxidarea lipidelor de la nivelul membranei plasmatică inducând destabilizarea membranei, dar și prin oxidarea proteinelor și acizilor nucleici. S-a constatat faptul că H₂O₂ prezintă efect antimicrobian față de o serie de tulpini aparținând genurilor: *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Candida* etc. Eliberarea și concentrația compușilor cu acțiune

antimicrobiană este dependentă de cele mai multe ori de condițiile de cultivare. În cadrul acestei etape au fost selectate câteva tulpini de bacterii lactice cu activitate antibacteriană și a fost evaluată producerea de H_2O_2 în condiții de cultivare.

Pentru determinarea concentrației de H_2O_2 bacteriile lactice au fost cultivate în mediu MRS timp de 24h la $37^{\circ}C$; după dezvoltare celulele au fost resuspendate în mediu RPMI 1640 fără roșu fenol (Biochrom), până la o densitate de 10^8 cel/ml. În paralel, tulpinile au fost cultivate în mediu RPMI 1640 suplimentat cu glucoză (1%) și respectiv cu $MnSO_4$ (0.04%), pentru a observa influența celor doi compuși asupra producerii de H_2O_2 . Probele au fost incubate timp de 4h la $37^{\circ}C$. Martorul este reprezentat de bacteriile lactice în mediu RPMI 1640 standard. Determinarea H_2O_2 eliberat de bacteriile lactice în mediu s-a realizat cu ajutorul kitului Amplex-red (Invitrogen, USA) prin citirea absorbantei la 590nm, utilizând sistemul BioTek- Synergy HTX Gen 52.06.

Cea mai ridicată concentrație de H_2O_2 a fost produsă de tulpina VL47 în mediu RPMI 1640, respectiv de $4.1 \mu M$ și de tulpinile P128, P141, P126 și P130 în mediu RPMI 1640 suplimentat cu $MnSO_4$ obținându-se concentrații peste $4 \mu M$. Creșterea concentrației de glucoză în mediu nu a determinat o modificare semnificativă a producerii de H_2O_2 , iar în cazul unor tulpini a indus chiar o scădere a acesteia (SE25, VL47, P141, P135).

Mai mult, prezența $MnSO_4$ în mediul de cultură a indus o creștere a producerii de H_2O_2 la 7 din cele 10 tulpini analizate. Este cunoscut faptul că bacteriile lactice nu prezintă gruparea hem și nu utilizează sistemul citocrom în procesele de oxidare. Ele prezintă o serie de flavoproteine care transformă oxigenul în H_2O_2 și, datorită faptului că nu prezintă catalază, are loc acumularea în exces a H_2O_2 (Pascual și colab., 2006). Deoarece bacteriile lactice nu prezintă superoxid dismutaza pentru a se proteja de speciile reactive de oxigen ele neutralizează superoxidul cu ajutorul ionilor de mangan (Archibald și Fridovich, 1981); din acest motiv am ales suplimentarea mediului cu Mn.

În vederea utilizării în practică, este esențial să se cunoască condițiile în care bacteriile produc cantitățile maxime de bacteriocine și modul în care se comportă acești compuși în prezența altor bacterii sau a altor compuși similari din mediu. Studiile din literatură arată că unele bacteriocine sunt produse în cantități mai mari în anumite condiții de stres (Kanmani și colab., 2012), inclusiv în cazul co-cultivării cu alte tulpini bacteriene (Maldonado-Barragan și colab., 2013). Compoziția mediului de cultură și condițiile de incubare afectează semnificativ producerea bacteriocinelor (Kanmani și colab., 2012; Pérez și colab., 2014). Mai mult, este cunoscut faptul că bacteriocinele sunt produse în cantități mai mari în fermentațiile *in vitro*, în condiții de laborator, decât *in vivo*, în matricea unui aliment fermentat, de exemplu (De Vuyst și Leroy, 2007).

În această etapă, cele trei tulpini de bacterii lactice selecționate în etapa anterioară, P40, P49 și P50, izolate din borș, au fost folosite pentru testarea efectului condițiilor de cultivare asupra creșterii și producerii de bacteriocine. În plus, a fost testată și capacitatea de creștere și producere de bacteriocine în prezența unor prebiotice sau exopolizaharide cu potențial prebiotic, ca unică sursă de carbon.

Pentru aceste experimente au fost testate mediile: MRS, BHI (Merck, Darmstadt, Germany), lapte de vacă (1.8% grăsime) și lapte de soia (ambele din comerț). În cazul mediului MRS au fost folosite variante cu diferite valori inițiale de pH: 3.0, 4.0, 5.0 și martorul cu pH 6.2. Pentru a testa influența compoziției mediului de cultură asupra producerii de bacteriocine, tulpinile producătoare de bacteriocine au fost cultivate în MRS normal (variantele martor) și diferite variante modificate de MRS: MRS cu zaharoză, fructoză, lactoză, galactoză sau manoză, ca unică sursă de carbon; MRS cu triptonă, hidrolizat de lactalbumină sau casaminoacizi (concentrație finală 20 g/l), în loc de substratul organic din mediul MRS normal; MRS fără Tween 80; MRS suplimentat cu NaCl în concentrație finală de 10, 20, sau 30 g/l;

MRS suplimentat cu CaCO₃ (20 g/l); MRS conținând săruri biliare în concentrație finală de 1, respectiv 2 g/l.

În fine, pentru a testa capacitatea de creștere și producere de bacteriocine în prezența prebioticeilor sau a exopolizaharidelor cu potențial efect prebiotic, mediul MRS preparat fără glucoză a fost suplimentat cu inulină sau lactuloză, în concentrație de 20 g/l, sau amestecuri de glucoză+ inulină, respectiv glucoză+ lactuloză, fiecare în concentrație de 10 g/l. În plus, au fost folosite medii suplimentate cu una din cele trei polizaharide produse de *Leuconostoc mesenteroides* 406 (Wouters și colab., 2013b), respectiv de două tulpini neidentificate, P109 și P127 (selectate în cursul acestei etape). În paralel, tulpinile producătoare de bacteriocine au fost co-cultivate cu tulpinile producătoare de exopolizaharide. Pentru toate variantele a fost determinată activitatea bacteriocinelor din supernatantul culturii, folosind metoda spoturilor.

Mediul optim pentru creștere și producere de bacteriocine a fost mediul MRS cu glucoză sau zaharoză; în anumite condiții de cultivare, deși creșterea a fost redusă, activitatea bacteriocinelor a fost similară sau chiar superioară matorului (de exemplu în lapte, în MRS conținând CaCO₃ sau săruri biliare). Unele condiții de stres (NaCl 1%) au stimulat producerea de bacteriocine. Tulpinile testate au avut capacitatea de a crește și de a produce bacteriocine în medii conținând prebiotice sau exopolizaharide bacteriene. Rezultatele obținute ne conduc la ideea că cele trei tulpini producătoare de bacteriocine, studiate de noi, au potențial pentru a fi folosite ca probiotice (activitatea mare în prezența sărurilor biliare) sau în industria alimentară (activitate mare în lapte, în prezența de NaCl etc.). Mai mult, activitatea antibacteriană este stimulată de unele prebiotice sau polizaharide potențial prebiotice. Acest ultim aspect are importanță în vederea utilizării unor exopolizaharide de origine bacteriană ca sursă de carbon pentru bacterii cu potențial prebiotic.

Tulpinile de interes au fost **identificate la nivel de specie**, folosind tehnici de biologie moleculară.

Identificarea tulpinilor de bacterii lactice poate fi realizată prin diferite metode ce presupun folosirea unor kit-uri comerciale bazate pe proprietățile fiziologice ale bacteriilor dar, ținând cont că bazele de date la care se raportează informațiile specifice pentru anumite tulpini bacteriene sunt realizate pe baza analizelor unor tulpini de interes medical, identificările făcute nu sunt întotdeauna corecte, fiind necesară confirmarea rezultatelor. Această confirmare se realizează prin folosirea metodelor moleculare, prin folosirea de primeri specie-specifici, prin analiza ARDRA a ampliconilor corespunzători genei pentru ARN16S, prin evidențierea polimorfismului secvențelor repetitive de la nivelul genomului bacterian (repPCR, ERIC PCR sau BOX PCR) sau prin determinarea secvenței de nucleotide a unor gene cunoscute.

În cadrul experimentelor efectuate au fost utilizați o serie de primeri specie-specifici, propuși în literatura de specialitate pentru identificarea speciilor *Lactobacillus plantarum*, *L. paraplantarum*, *L. pentosus*, *L. rhamnosus* și *L. acidophilus* (Tabelul 7), precum și primeri recomandați pentru analiza secvențelor repetitive.

Pentru izolarea ADN total din tulpinile bacteriene de interes a fost utilizată metoda lui Gevers și colab. (2001) care a permis obținerea unor probe de ADN utilizabil pentru reacțiile de amplificare (Fig. 11). Alternativ, pentru izolarea ADN a fost folosit și un kit special de extracție (Macherey Nagel GmbH & Co. KG, Germania).

Pentru identificarea speciilor menționate mai sus au fost realizate reacții PCR multiplex, folosind indicațiile autorilor. În urma analizei electroforetice a produșilor de amplificare s-a constatat faptul că tulpinile 15, 22, 26, 35, 58 și 115 aparțin speciei *L. plantarum*.

În privința evaluării eventualelor diferențe la nivel molecular dintre tulpinile de bacterii lactice utilizate în experimente, a fost utilizată metoda rep-PCR. Rep-PCR este o metodă de genotipare care generează profiluri electroforetice specie-specifice prin amplificarea elementelor repetitive prezente la nivelul genomului. Identificate inițial la nivelul genomului de *E. coli*, elementele repetitive sunt în prezent folosite pentru genotiparea a numeroase specii

de procariote, inclusiv de bacterii lactice. Pentru genotipare au fost propuse cinci metode de tip rep-PCR ce urmăresc diferite secvențe repetitive cu primeri specifici: REP-PCR (setul de primeri Rep1R-I și Rep2-I); ERIC-PCR (setul de primeri ERIC1R și ERIC2); ERIC2-PCR (primerul ERIC2); BOX-PCR (primerul BOX A1R) și (GTG)₅-PCR [primerul (GTG)₅] (Versalovic et al. 1994). Cele mai bune rezultate au fost obținute cu primerii BOX A1R și (GTG)₅.

În cazul utilizării BOX-PCR se remarcă faptul că la majoritatea tulpinilor identificate prin PCR-specie specific ca aparținând speciei *L. plantarum*, profilul electroforetic al ampliconilor este identic (tulpinile 15, 26, 35 și chiar 115). La tulpina 58 pot fi observate unele diferențe comparativ cu tulpina de referință Lpl. În cazul tulpinilor 61 și 49 profilul de amplificare pare a fi identic, asemănător cu cel al tulpinii 43. Profile diferite au fost obținute la tulpinile 8 și 22.

Și în cazul primerului (GTG)₅ au fost observate profile identice între diferite tulpini. Pe baza profilurilor electroforetice, tulpinile analizate au fost grupate în mai multe cluster. Din fiecare astfel de cluster a fost selectată câte o tulpină pentru care se va face în etapa următoare o identificare la nivel de specie prin secvențializarea ARNr 16S.

Folosirea primerului ERIC-PCR a condus la obținerea unor rezultate nu la fel de clare ca în cazul BOX-A1R dar, în general ele confirmă aspectele evidențiate în primul caz.

Cele trei tulpini producătoare de bacteriocine, selectate în etapa anterioară, au fost identificate prin secvențializarea ARNr16S. Tabelul 1 prezintă identificarea acestor tulpini și similaritatea acestora cu tulpini din bazele de date recunoscute.

Tabelul 1. Afilierea taxonomică a tulpinilor producătoare de bacteriocine (Grosu-Tudor și colab., 2014)

Tulpina	Bacteria cea mai apropiată (accession number)	Procentul de identitate a nucleotidelor (%)
<i>Lactobacillus amylolyticus</i> P40	<i>Lactobacillus amylolyticus</i> strain TUST015 (KC456629.1)	93
<i>Lactobacillus oris</i> P49	<i>Lactobacillus oris</i> strain F0423 (HM596285.1)	98
<i>Lactobacillus amylolyticus</i> P50	<i>Lactobacillus amylolyticus</i> strain TUST015 (KC456629.1)	99

Tehnica ARDRA este o metodă rapidă și ieftină de evaluare a profilelor obținute în urma digestiei enzimatică cu diverse endonucleaze de restricție a genei ce codifică pentru ARNr 16S. După obținerea ampliconilor pentru gena care codifică pentru ARNr 16S, aceștia au fost digerați cu 2 endonucleaze de restricție (în reacții separate) și anume cu *Hae* III și *Msp* I. Schema de reacție a inclus 10U de enzimă la volum de 30μl total de reacție cu un timp de incubare de 3 ore la 37°C. Verificarea electroforetică a produșilor de restricție s-a realizat prin electroforeză în sistem orizontală folosind o concentrație de agaroză de 2,5%. Am folosit programul Quantity One (BioRad) care ne-a permis realizarea unor arbori filogenetici în vederea determinării gradului de înrudire între tulpinile de bacterii lactice analizate.

Din analiza gelurilor de restricție au fost determinate *pattern-urile* ARDRA ale tulpinilor de bacterii lactice luate în lucru, calculându-se dimensiunile fragmentelor de restricție rezultate. Pe baza analizei profilurilor ARDRA putem să tragem următoarele concluzii: tulpinile P8, P35, P39, P130, P141, SE25, aparțin aceleiași unități taxonomice operaționale (OTU = Operational Taxonomic Unit), acestea putând fi încadrate în genul *Lactobacillus*; tulpina VL47 a prezentat un *pattern* diferit, asemănător cu specia *Enterococcus faecium*; tulpina P126 a prezentat un profil similar cu cel al tulpinii de referință *Pediococcus*

pentosaceus; tulpinile P135 și P128 au prezentat un profil distinct, acestea urmând a fi încadrate în urma analizei rep-PCR.

În urma folosirii tehnicii repPCR ampliconii obținuți au fost analizați în gel de agaroză de concentrație 2,5%. Pentru stabilirea gradului de înrudire filogenetică s-a folosit programul Quantity One (BioRad).

În urma analizei dendrogramelor obținute pe baza profilurilor rep-PCR putem spune că: tulpinile P8, P35, P39, P130 și P141 fac parte din același cluster cu tulpina *Lb. plantarum* ATCC 8014; tulpina SE25 a prezentat un profil apropiat cu specia *Lb. fermentum* ATCC 9338; tulpina VL47 a prezentat un *pattern* identic cu tulpina *Enterococcus faecium* ATCC 35667; tulpina P126 a prezentat un profil similar cu cel al tulpinii de referință *Pediococcus pentosaceus*; tulpinile P135 și P128 fac parte din același cluster cu tulpinile din genul *Lactobacillus*, dar acestea au prezentat un indice de similitudine scăzut cu tulpina *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* BAA-52.

CONCLUZII

Obiectivele etapei III/2014 au fost îndeplinite în totalitate. Au fost selectate noi tulpini producătoare de exopolizaharide, iar compușii respectivi au fost izolați, purificați și caracterizați. A fost investigată natura compușilor responsabili pentru activitatea antibacteriană/antifungică a tulpinilor selectate în etapa anterioară și a fost studiat efectul condițiilor de cultură asupra activității bacteriocinelor produse de trei dintre tulpini. În fine, tulpinile de interes au fost identificate la nivel de specie prin metode moleculare.

Principalele rezultate:

1. Un număr de 9 tulpini de bacterii lactice au fost selectate datorită capacității de a produce exopolizaharide. Polimerii sunt produși în cantități variabile, până la aproximativ 20 g/l, au masa moleculară mare și, pe baza cromatografiei în strat subțire, se pare că sunt formați din monomeri de galactoză și riboză sau xiloză. Trei dintre EPS au un potențial efect prebiotic, fiind rezistente la pH acid și în prezența unor enzime digestive și putând fi metabolizate ușor de alte bacterii lactice cu efect antibacterian.
2. Din multitudinea de tulpini bacteriene testate în etapele anterioare pentru activitate antifungică, au fost menținute pentru caracterizare și alte analize un număr de 10 tulpini noi și două tulpini de colecție; spectrul de acțiune al acestora este larg, incluzând fungi fitopageni, fungi de depozit, inclusiv cu potențial de producere a micotoxinelor (aflatoxine, trichotecene, ochratoxină) și drojdii.
3. Activitatea antifungică se datorează, la majoritatea tulpinilor bacteriene, producerii de acizi organici, cei mai buni producători de acid lactic, acid acetic, acid hidroxifenilactic și acid fenilactic fiind tulpinile P15, P35 și P61.
4. Au fost realizate experimente ce au vizat determinarea capacității unora dintre tulpinile bacteriene selectate de a degrada/îndepărta DON. Analiza HPLC a supernatantului de cultură și a lichidului de spălare a celulelor tratate cu DON a evidențiat o reducere semnificativă a nivelului DON în cazul tulpinilor P58 și P61. În cazul tulpinii P61 este clar că DON este eliminat din supernatant prin legarea sa la suprafața celulelor. În cazul tulpinii P58 nivelul DON este extrem de mic atât în supernatant cât și în lichidul de spălare, ceea ce sugerează posibile mecanisme degradative.
5. Mediul optim pentru creștere și producere de bacteriocine este mediul MRS cu glucoză sau zaharoză; în anumite condiții de cultivare, deși creșterea este redusă, activitatea bacteriocinelor este similară sau chiar superioară matorului (de exemplu în lapte, în MRS conținând CaCO₃ sau săruri biliare). Unele condiții de stres (NaCl 1%) stimulează producerea de bacteriocine. Tulpinile testate au capacitatea de a crește și produce

bacteriocine în medii conținând prebiotice sau exopolizaharide bacteriene cu efect potențial prebiotic.

6. Au fost identificate la nivel de specie tulpinile producătoare de bacteriocine, patru dintre cele cu activitate antifungică și alte 10 tulpini, cu activitate antibacteriană. Majoritatea tulpinilor identificate aparțin genului *Lactobacillus*. Tehnica rep-PCR a permis gruparea tuturor tulpinilor din colecția proiectului, urmând ca aceste grupuri să fie identificate prin secvențializarea ARNr16S, în vederea realizării unui raport privind diversitatea bacteriilor lactice în anumite alimente fermentate, cum ar fi borșul.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. De Vuyst, L. and Leroy, F. (2007) Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *J Mol Microbiol Biotechnol* 13, 194-199.
2. De Vuyst, L., Degeest, B., 1999, *FEMS Microbiol. Rev.*, 23, 153-177.
3. Franco, T.S., S.Garcia, E.Y. Hirooka, Y.S. Ono, J.S. dos Santos, 2011, Lactic acid bacteria in the inhibition of *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol detoxification, *Journal of Applied Microbiology* 111, 739-748
4. Gevers, D., G.Huys, J.Swings, 2001, Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species, *FEMS Microbiology Letters* 205, 31-36
5. Haros, M., M.Bielecka, J.Honke, Y.Sanz, 2008, Phytate-degrading activity in lactic acid bacteria, *Polish Journal Food Nutrition Sciences*, 58, 33-40
6. Kanmani P, Kumar RS, Yuvaraj N, Paari KA, Pattukumar V, Arul V: Application of response surface methodology in the optimisation of a growth medium for enhanced natural preservative bacteriocin production by a probiotic bacterium. *Nat Prod Res* 2012, 26:1539-1543.
7. Maldonado-Barragan A, Caballero-Guerrero B, Lucena-Padros H, Ruiz-Barba JL: Induction of bacteriocin production by coculture is widespread among plantaricin-producing *Lactobacillus plantarum* strains with different regulatory operons. *Food Microbiol* 2013, 33:40-47.
8. Perez R.H., Zendo T., Sonomoto K. (2014), Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microbial Cell Factories* 13 (Suppl. 1), 11-53.
9. Sato, I., Ito, M., Ishizaka, M., Ikunaga, Y., Sato, Y., Yoshida, S., Koitabashi, M, Tsushima, S., 2012. Thirteen novel deoxynivalenol-degrading bacteria are classified within two genera with distinct degradation mechanisms. *FEMS microbiology letters*, 327(2), 110-117.
10. Sul, S.Y., H.J. Kim, T.W. Kim, H.Y. Kim, 2007, Rapid Identification of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in Probiotic Products Using Multiplex PCR, *J. Microbiol. Biotechnol.*, 17(3), 490-495
11. Sumengen, M., S.Dincer, A.Kaya, 2012, Phytase production from *Lactobacillus brevis*, *Turk. J.Biol.*, 36, 533-541
12. Sumengen, M., S.Dincer, A.Kaya, 2013, Production and characterization of phytase from *Lactobacillus plantarum*, *Food Biotechnology*, 27:2, 105-118
13. Torriani, S., G.E.Felis, F.Dellaglio, 2001, Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* Gene Sequence analysis and Multiplex PCR Assay with *recA* Gene-Derived Primers, *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(8):3450
14. Van der Meulen, R., Grosu-Tudor, S., Mozzi, F., Vanningelgem, F., Zamfir, M., De Vuyst, L., 2007, *Int. J. Food Microbiol.*, 118, 250-258.
15. Versalovic J, Schneider M, De Bruijn FJ, Lupski JR, 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction *Meth. Mol. Cell. Biol.* 5: 25-40
16. Wouters D., Grosu-Tudor S., Zamfir M., De Vuyst L., 2013. Applicability of *Lactobacillus plantarum* IMDO 788 as a starter culture to control vegetable fermentations, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, p 3352 -3361.
17. Pascual L.M., Daniele M.B., Pajaro C., Barberis L., 2006. *Lactobacillus* species isolated from the vagina: identification, hydrogen peroxide production and nonoxynol-9 resistance, *Contraception* 73: 78- 81.
18. Archibald S., Fridovich I., 1981. Manganese, Superoxide Dismutase, and Oxygen Tolerance in Some Lactic Acid Bacteria, *Journal of Bacteriology*, Vol. 146, No. 3, p. 928-936.

Lucrări publicate din proiect:

1. Grosu-Tudor S.S., Stancu M.M., Pelinescu D., Zamfir M., 2014. Characterization of some bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from fermented foods. *World J Microbiol Biotechnol*, 30(9), p. 2459-2469.
2. Zamfir M., Cornea C.P., De Vuyst L., Grosu-Tudor S.S., 2014. Biodiversity and biotechnological potential of lactic acid bacteria. *AgroLife Scientific Journal* vol. 3(1), ISSN 2285-5718, p. 169-176.
3. Grosu-Tudor S.S, Zamfir M., 2014. Exopolysaccharide production by selected lactic acid bacteria isolated from fermented vegetables. *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies*, Vol. XVIII, ISSN 2285-1364, p. 107-114.
4. Siciua O. A., Israel-Roming F., Ciobotariu O., Matei A., Zamfir M., Ciucă M., Cornea C. P., 2014. Antifungal action of lactic acid bacteria isolated from plant materials against mycotoxigenic fungi. *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies*, Vol. XVIII, ISSN 2285-1364, p. 234-240.
5. Cornea C.P., Siciua O.A., Israel-Roming F., Toma R., Zamfir M., 2014. Interactions of indigenous lactic acid bacteria isolated from vegetal sources with spoilage fungi, *Proceedings of the IInd INTERNATIONAL CONGRESS "FOOD TECHNOLOGY, QUALITY AND SAFETY"*, NOVI SAD 2014, SERBIA, ISBN 978-86-7994-043-8, Publisher Univ.Novi Sad, Institute of Food Technology, p. 632-637.