

ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ імені І. І. МЕЧНИКОВА
Біологічний факультет

Кафедра мікробіології, вірусології та біотехнології

**Дипломна робота
бакалавра**

*на тему: «Біотехнологія антимікробних сполук з лактобак-
терій морського походження»*

Biotechnology of antimicrobial compounds from lactobacteria of marine origin

Виконала: студентка IV курсу
денної форми навчання
Спеціальність 162 Біотехнології та
біоінженерія
Ковальчук Роксолана Романівна

Науковий керівник
кандидат біологічних наук, доцент
Мерліч Андрій Геннадійович

Рецензент:
кандидат біологічних наук, доцент
Підгорна Світлана Яківна

Рекомендовано до захисту:
Протокол засідання кафедри
№ _____ від «___» _____ р.
(за національною шкалою, шкалою ECTS, бал)

Захищено на засіданні ЕК № _____
Протокол № _____ від «___» _____ р.
Оцінка _____ / _____ / _____

Завідувач кафедри

(підпис) **Філіпова Т.О.**
(прізвище та ініціали)

Голова ЕК

(підпис) **Іваниця В.О.**
(прізвище та ініціали)

АНОТАЦІЯ

Дослідження проведено в Біотехнологічному науково-навчальному центрі та на кафедрі мікробіології, вірусології та біотехнології ОНУ імені І.І. Мечникова протягом 2022/2023 навчального року. Мета дослідження – отримання антимікробних сполук з лактобактерій морського походження та розробка біотехнології їх напрацювання. Визначено, що використані у наших дослідах ізоляти МКБ з морської води проявили високу інгібувальну активність проти умовно-патогенних бактерій. Відібрано найактивніші антагоністи для біотехнологічного застосування. У більшості випадків основним чинником антимікробної активності були органічні кислоти.

Курсову роботу «Біотехнологія антимікробних сполук з лактобактерій морського походження» викладено на 39 сторінках, вона включає 5 рисунків, 4 таблиці. У роботі наведено посилання на 76 джерел літератури (7 кирилицею та 69 латиницею).

Ключові слова: *МКБ, антимікробні сполуки, органічні кислоти, антагоністична активність.*

The research was carried out at the Biotechnology Scientific and Training Center and at the Department of Microbiology, Virology and Biotechnology of the I.I. Mechnikov during the 2022/2023 academic year. The purpose of the work was to obtain antimicrobial compounds from lactobacilli of marine origin and to develop biotechnology for their production. It was determined that the LAB isolates from seawater used in our experiments showed high inhibitory activity against opportunistic bacteria. The most active antagonists were selected for biotechnological use. In most cases, the main factors of antimicrobial activity were organic acids.

The coursework "Biotechnology of antimicrobial compounds from lactobacilli of marine origin" is laid out on 39 pages, it includes 5 figures, 4 tables. The work contains references to 76 sources of literature (7 in Cyrillic and 69 in Latin).

Key words: LAB, antimicrobial compounds, organic acids, antagonistic activity.

ЗМІСТ

ВСТУП	4
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	6
1.1. Характеристика лактобактерій з солоних та прісних водойм	6
1.2. Антимікробні властивості морських лактобактерій проти патогенних бактерій	9
1.3. Сполуки з антимікробними властивостями морських лактобактерій та їх біотехнологічний потенціал	12
2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	16
2.1. Штами бактерій та умови їх культивування	16
2.2. Отримання добових культур лактобактерій та визначення їх рН ...	17
2.3. Визначення антимікробної активності морських лактобактерій та відбір найактивніших антагоністів	17
2.4. Статистична обробка даних	18
2.5. Напрацювання метаболітів з антимікробними властивостями та визначення їх природи.....	18
3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	20
3.1. Визначення рН добових культур	20
3.2. Інгібувальна активність морських лактобактерій проти умовно-патогенних бактерій	21
3.3. Напрацювання антимікробних сполук морських МКБ та визначення їх природи	24
3.4. Біотехнологічна схема напрацювання антимікробних сполук лактобактерій морського походження	28
ВИСНОВКИ	30
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	31

ВСТУП

Молочнокислі бактерії (МКБ) є Грам позитивними, каталазонегативні, аеротолерантними, зазвичай нерухомими і неспороутворюючими мікроорганізми, які продукують молочну кислоту в якості основного, або єдиного продукту ферментативного метаболізму [Lindgren et al., 1990]. Не дивлячись на складні потреби в поживних речовинах, лактобактерії зустрічаються в багатьох екологічних нішах, що вказує на їх адаптивні характеристики. Недавній інтерес до МКБ, що населяють саме водні тварини був показаний в нечисельних наукових роботах, опублікованих за останні 5 років [Francoise, 2010].

Незважаючи на велику кількість інформації про МКБ, що населяють організми ендотермічних тварин у науковій літературі зустрічаються лише поодинокі дослідження присвячені лактобактеріям саме з водних джерел, наприклад з морських та прісноводних мешканців [Franzmann et al., 1991; Gatesoupe, 1999; Ishikawa et al., 2005; Bucio et al., 2006; Ringo et al., 2010].

Море, а особливо у прибережних районах, рясніє мертвою і живою біотою, яка є багатим джерелом поживних речовин, необхідних для росту гетеротрофних мікроорганізмів. Було проведено безліч екологічних і таксономічних досліджень морських бактерій, але більшість з них були зосереджені на аеробних або факультативно-анаеробних Грам негативних бактеріях. Виділення і таксономічні дослідження МКБ з морського середовища, як правило, обмежувалися морською рибою, вирощуваною на фермах [Franzmann, 1991; Ringo et al., 2010]. В останні роки все більше уваги приділяється вченими виділенню морських МКБ з живих і відмерлих морських організмів, а також з глибоководних донних відкладень [Ishikawa et al., 2005; Toffin et al., 2005].

Зростання інтересу до морських лактобактерій зумовлено антагоністичною активністю даних мікроорганізмів проти багатьох споріднених і неспоріднених бактерій, включаючи збудників псування харчових продуктів та збудників захворювань, що зумовлює їх біотехнологічний потенціал. Механізмами їх інгібувальної дії є зниження рН, конкуренція за поживні речовини та продукція метаболітів з інгібувальною активністю. Стосовно МКБ водного

походження, то вони ще й здаються перспективними для здійснення профілактики захворювань в аквакультури, що являє собою альтернативний спосіб скорочення застосування антибіотиків [Gatesoupe 1999; Panigrahi et al., 2004]. Крім того, з'явилося повідомлення про використання МКБ водного походження в якості пробіотиків для ссавців, а останнім часом й для прісноводних амфібій [Pasteris et al., 2009]. Морські МКБ є досить важливою групою мікроорганізмів також і тому, що вони можуть відігравати значну роль у перетворенні органічної речовини, особливо на поверхні глибоководних морських відкладень, що говорить про їх екологічну роль [Kathiresan et al., 2008]. МКБ морського походження можуть використовуватися як біоконсерванти, особливо в промисловості морепродуктів [Indira et al., 2011].

Однак, що стосується лактобактерій саме з Чорного моря та їх біотехнологічного потенціалу, то подібні повідомлення є надзвичайно обмеженими. Враховуючи широкий біотехнологічний потенціал цієї групи бактерій, подібні дослідження є вкрай необхідними.

Метою даної роботи було отримання антимікробних сполук з лактобактерій морського походження та розробка біотехнології їх напрацювання.

Завдання:

1. Перевірити антимікробну активність ізолятів МКБ з морської води та мідій проти умовно патогенних бактерій.
2. Відібрати найактивніші антогоністи для біотехнологічного застосування.
3. Отримати антимікробні сполуки та визначити природу інгібувальної активності.
4. Розробити біотехнологічну схему для напрацювання антибактеріальних сполук з морських МКБ.

Об'єкт дослідження – біотехнології на основі лактобактерій та продуктів їх метаболізму.

Предмет дослідження – антимікробні сполуки морських лактобактерій та біотехнології їх отримання.

1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Характеристика лактобактерій з солоних та прісних водойм

Молочнокислі бактерії (МКБ) є одними з найбільш добре вивчених мікроорганізмів, що складають велику групу корисних бактерій, які продукують молочну кислоту з вуглеводів при ферментації. Лактобактерії є Грам позитивними, аеротолерантними анаеробами, що не здатні до спороутворення. За своєю морфологією можуть бути як паличками так і коками, які часто зустрічаються в ланцюжках [Lindgren et al., 1990]. Лактобактерії мають хромосомну стійкість до ряду антибіотиків, яка варіюється в залежності від виду і штаму [Schnürer et al., 2005; Makras et al., 2006]. У науково-технічній літературі є відомості, що МКБ не містять плазмідної ДНК, небезпечної для поширення антибіотикостійкості серед інших бактерій. У них поширені лише плазміди з малою молекулярною масою (менше 10 МДа), які не здатні до самостійного перенесення, що робить можливим їх широке лікувально-профілактичне використання [De Vuyst et al., 1994; Schnürer et al., 2005; Nes et al., 2004; Makras et al., 2006].

Вони широко поширені в природі і можуть бути виділені з зерна, зелених рослин, ферментованих овочів, молочних і м'ясних продуктів, зі слизової оболонки тварин [Lindgren et al., 1990], а також зі свіжих і відмерлих губок, морських водоростей, молюсків, крабів і риб морського середовища [Gatesoupe et al., 1999; Ishikawa et al., 2005; Ringo et al., 2010].

Рід *Lactobacillus*, представники якого відносяться до МКБ, є одним із родів бактерій, що в основному населяють морське середовище разом з бактеріями родів *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Xanthomonas*, *Micrococcus*, *Achromobacter* [Austin, 1989; Bernan et al., 1997; Jayanth et al., 2002]. Детально описаних штамів МКБ з морського середовища невелика кількість, в основному з регіону Тихого океану Японії [Franzmann et al., 1991]. Представники групи МКБ виділялись з прибережних і гирлових відкладень, особливо тих, які є багатими на органічні речовини [Varnam, 2002]. Було повідомлено про виділення двох видів, а саме *Carnobacterium funditum* і *C.*

alterfunditum з озера Ейс в Антарктиці [Spielmeier et al., 1993]. Один новий вид, *Marinilactobacillus psychrotolerance* було виділено з мертвих і живих морських організмів на півострові Міура в Японії [Ishikawa et al., 2005], тоді як штами, подібні до карнобактерій, ізолювалися з западини Нанкай на південному сході Японії [Newberry et al., 2004]. Кілька представників роду *Marinilactobacillus* було отримано також з прибережних донних відкладень Охотського моря в Японії [Inagaki et al., 2003]. Два нових види МКБ, а саме *Halolactibacillus halophilus* і *H. miurensis*, були виявлені у живих організмів з моря і таких, що розкладаються, відібраних у помірній зоні Японії [Ishikawa et al., 2005].

Болгарськимим дослідниками Ignatova-Ivanova et al. [2022] було виділено два нових ізоляти МКБ з *Mytilus galloprovincialis* Lamarck з болгарської акваторії Чорного моря, які були ідентифіковані як *Lactobacillus sp.* та охарактеризовані як культури з перспективною протигрибковою активністю.

З *Mytilus galloprovincialis* Lamarck було виділено 4 види МКБ - *Sporolactobacillus kofuensis*, *Lactobacillus sakei*, *Streptococcus gallolyticus ss gallolyticus* і *Lactibacillus brevis*, які проявляли антимікробні властивості [Bryamova et al., 2020]. Чорноморська мідія (*M. galloprovincialis* Lam.) фактично є єдиним морським видом, що вирощується з метою аквакультури у болгарській частині Чорного моря.

Морське середовище є перспективним джерелом нових біологічно активних сполук зі зміцнювальними властивостями, які можна використовувати як харчові добавки [Imhoff et al., 2011]. Ishikawa et al. [2005] вперше запропонував термін «морські молочнокислі бактерії» для МКБ, виділених з морських організмів, які продемонстрували унікальні структурні характеристики та потенційну біологічну активність порівняно з наземними штамами [Kathiresan et al., 2008].

Морські МКБ володіють унікальними особливостями, які відрізняються від наземних лактобактерій. Так види роду *Carnobacterium* з антарктичного озера є нейтрофільними, тобто найкраще ростуть при рН 7,0. Коли дані

мікроорганізми вирощують в бульйонній з рН 8,5, кінцевий рН знижується до 4.7-5.2. Цей низький рівень рН може інгібувати інші бактерії, присутні в лужному середовищі, пов'язаному з морською водою [Spielmeyer et al., 1993]. Однак морський штам *M. psychrotolerans* може витримувати лужні і кислі умови з рН в діапазоні від 6,0 до 10,0. Таким чином, він не здатний створювати кислі умови, як майже всі інші наземні МКБ, які краще ростуть при слабкокислій реакції поживного середовища і пригнічують інші мікроорганізми завдяки підкисленню середовища культивування. Також, *M. psychrotolerans* росте в широкому діапазоні температур: від $-1,8^{\circ}\text{C}$ і від точки замерзання морської води до $40 - 45^{\circ}\text{C}$, тоді як оптимальна температура для культивування даного мікроорганізму складає $37 - 40^{\circ}\text{C}$. Таким чином, оптимальні і максимальні температури для його росту помітно вище, ніж у звичайних морських бактерій. Штам є галотолерантним і може рости при концентрації NaCl від 0 до 20,5%, маючи оптимальну концентрацію солі для росту 2.0 – 3,75% [Ishikawa et al., 2005].

Бактерії іншого виду МКБ - *M. piezotolerans* ростуть при оптимальному тиску 0,1 МПа та витримують до 30 МПа. Вони є мезофілами і здатними рости при концентрації NaCl 0 – 12% з оптимальним діапазоном концентрації солі для росту 1 – 2% [Toffin et al., 2005].

Іноземними дослідниками також було розроблено нову, чітко визначену закваску лактобактерій морського походження, призначену для ферментації морських водоростей з метою виходу з них біоактивних молекул [Sowmya et al., 2011]. Також відомо про штам морських МКБ, який використовувався для ферментації бурих водоростей - *Enterococcus faecium* P1-2CB-w1, що при оптимальному періоді ферментації призводив до максимальної антикоагулянтної та антиоксидантної активності [Shobharani et al., 2012].

Отже, лактобактерії з водних джерел характеризуються унікальними особливостями та відрізняються від МКБ, що населяють наземні біотопи. Не дивлячись на наявність достатньої кількості інформації про біотехнологічний потенціал МКБ з різних джерел, інформація про морські лактобактерії в да-

ному контексті є дуже обмеженою. Це свідчить про необхідність дослідження МКБ з моря на здатність до продукції різноманітних антимікробних сполук що, ймовірно, приведе до відкриття нових штамів з цінними властивостями для медицини та блакитної біотехнології та сприятиме вирішенню багатьох проблем сьогодення.

1.2. Антимікробні властивості морських лактобактерій проти патогенних бактерій

Однією з причин широкого застосування лактобактерій є їх виражені антимікробні властивості. Відомо, що МКБ демонструють широкий спектр антимікробної активності. З літературних джерел відомо про високу пригнічувальну активність бактерій різних видів та штамів МКБ та їх бактеріоцинів проти патогенних та бактерій, які псують продукти. Таким чином, була описана інгібувальна активність МКБ щодо *Listeria innocua*, *S. aureus*, *Hafnia alvei* [Ammor et al., 2006], *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* [Amel et al., 2015, Elayaraja et al., 2014], *L. monocytogenes* [Kim et al., 2015]. Показана інгібувальна активність штамів бактерій *L. plantarum* щодо *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Salmonella enteritidis* [Arena et al., 2016]. Ріст штамів грибів *Candida albicans* пригнічувалася сполуками білкової природи ентерококів [Shekh et al., 2012].

У багатьох публікаціях показана антагоністична активність лактобактерій щодо різних фітопатогенів. Таким чином, вітчизняні вчені показали, що штами *L. plantarum* пригнічували ріст фітопатогенних бактерій *Rhizobium radiobacter* C58 *in vitro* та *in vivo*. Цікаво, що три досліджувані штами цього виду МКБ зменшували симптоми захворювання не в однаковій мірі [Limanska et al., 2014]. Також було показано, що усунення симптомів захворювання, що викликає *R. radiobacter*, було досягнуто шляхом додавання бактерій штаму *L. plantarum* ОНУ 87 разом з автолізатом фітопатогенного бактеріального штаму *Erwinia carotovora* ZM1 [Korotaeva et al., 2013]. В іншій ро-

боті вітчизняних авторів лактобактерії також інгібували *R. radiobacter* [Васильюк та ін., 2014a].

В останні роки була проведена певна робота й по вивченню антимікробних властивостей морських МКБ [Кулієв та ін., 2017]. Встановлено, що морепродукти є джерелом МКБ, які синтезують речовини, що мають антимікробну активність проти багатьох патогенних мікроорганізмів [Khouadja, 2017]. Споживання продуктів, що містять велику кількість хімічних консервантів, викликало інтерес до використання натуральних і мінімально оброблених харчових продуктів з акцентом на використання антимікробних засобів природного походження - біоконсервантів, таких як бактеріоцини [Francoise, 2010].

В Індонезії було отримано шістдесят два ізоляти МКБ із ферментованої риби - бекасаму, які проявляли антимікробну ефективність проти росту патогенних бактерій. Показано, що 90% досліджених ізолятів МКБ пригнічували ріст *L. monocytogenes*. Відсоток ізолятів МКБ, який інгібував ріст *S. typhimurium*, *E. coli*, *B. cereus* та *S. aureus* становив 79%, 73%, 71% та 66%, відповідно. Найбільші зони інгібування та найвищий індекс інгібування були у *S. aureus*. Однак культуральний супернатант ізолятів МКБ не утворював зони інгібування при нейтральному рН. Цей результат вказує на те, що інгібувальна активність МКБ з індонезійського бекасаму була обумовлена органічними кислотами, і вони, ймовірно, є основним консервуючим фактором у бекасамі. Антибактеріальні сполуки, що продукуються МКБ, отримані з бекасама, можуть бути використані для боротьби з патогенними мікроорганізмами при ферментації даної риби. Вони можуть сприятливо впливати на ферментований продукт, тобто зробити його більш стабільним, а метаболіти, які утворюються під час ферментації, поліпшать смак, аромат і текстуру продукту [Desniar et al., 2013].

В роботі болгарських вчених Ignatova-Ivanova et al. [2022] було показано антимікробну активність МКБ, виділених із чорноморської мідії *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819. Дослідники виділили чотири види МКБ -

Sporolactobacillus kofuensis, *L. sakei*, *Streptococcus gallolyticus* та *Lactibacillus brevis*. Виділені штами були перевірені щодо антимікробної активності проти ряду патогенних бактерій: *Escherichia coli* NBIMCC3398, *Staphylococcus aureus* NBIMCC745, *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Salmonella typhimurium* NBIMCC3591, *Listeria monocytogens* NBIMCC863, *Enterobacter aerogenes* NBIMCC3691, *Aspergillus niger* NBIMCC, *Penicillium claviforme* NBIMCC, *Saccharomyces cerevisiae* NBIMCC, *Candida albicans* NBIMCC 8673 і *Candida glabrata* NBIMCC72.

Дослідниками було встановлено, що при культивуванні в середовищі, що містить 2% фруктоолігосахариду вид *St. gallolyticus* ss *gallolyticus* дає максимально великі зони інгібування *E. aerogenes* 3691, вид *L. brevis* – *A. niger*, вид *L. sakei* – *E. aerogenes* 3691, вид *Sp. kofuensis* – *B. subtilis* 6633, *L. monocytogen* 863 і *S. aureus* 745. Вид *L. brevis* проявляє високий рівень інгібування *E. coli* 3398, *S. aureus* 745, *B. subtilis* 6633 і *L. monocytogens* 863 при культивуванні в присутності 5% фруктоолігосахариду, а види *St. gallolyticus* ss *gallolyticus*, *L. sakei* та *Sp. kofuensis* проявляли відносно високу активність проти цих патогенних видів бактерій [Ignatova-Ivanova et al., 2022].

Щодо культивування бактерій в 10% розчині глюкози, то види *L. brevis* та *L. sakei* утворювали зони інгібування відносно до *C. albicans* 8673, *E. aerogenes* 3691, *E. coli* 3398, *L. monocytogens* 863, *A. niger* і *P. slaviforme*, *S. cerevisiae*. При культивуванні бактерій видів *St. gallolyticus* ss *gallolyticus* і *L. sakei* на глюкоолісахариді спостерігається максимально висока інгібувальна активність проти *B. subtilis* 6633. Відносно високу пригнічувальну активність проявляє вид *St. gallolyticus* ss *gallolyticus* проти *E. aerogenes* 3691, *E. coli* 3398, *S. aureus* 745, *B. subtilis* 6633 і *L. monocytogens* 863. Що стосується виду *Sp. kofuensis*, то він проявляє високий рівень інгібування *E. aerogenes* 3691 при культивуванні на 5% глюкоолігосахариді та помірний рівень пригнічення *E. coli* 3398, *L. monocytogens* 863 і *B. subtilis* 6633 [Ignatova-Ivanova et al., 2022].

Отже, аналізуючи данні літератури можна зробити висновок, що незважаючи на наявність у науковій літературі даних щодо антимікробної активності МКБ різного походження проти патогенних бактерій, лактобактерій з Одеського узбережжя Чорного моря є дослідженими недостатньо.

1.3. Сполуки з антимікробними властивостями морських лактобактерій та їх біотехнологічний потенціал

Людство використовувало МКБ для виробництва ферментованих продуктів через їх здатність викликають бажані зміни смаку, аромату та текстури, а також завдяки пригніченню ними патогенних і псувних мікроорганізмів. Оскільки вони беруть участь у численних ферментаціях їжі протягом тисячоліть, передбачається, що більшість представників цієї групи не становлять жодного ризику для здоров'я людини і позначаються як GRAS (загальновизнані як безпечні) організми [Holzapfel et al., 1995]. Різні антимікробні речовини, такі як молочна кислота, оцтова кислота, перекис водню, вуглекислий газ і бактеріоцини, що продукуються цими бактеріями, можуть пригнічувати патогенні мікроорганізми та мікроорганізми, що викликають псування, подовжуючи термін придатності та підвищуючи безпеку харчових продуктів [Aumerich et al., 2000].

МКБ демонструють широкий спектр антимікробної активності. Головним її чинником є продукція органічних кислот – молочної та оцтової. Однак відомо, що деякі штами МКБ продукують також і біоактивні молекули, такі як етанол, мурашина кислота, жирні кислоти, реутерин та реутерицин. Висунуто припущення про можливість лактобактерій продукувати азелаїнову кислоту [Broberg et al., 2007].

Крім органічних кислот лактобактерії здатні виділяти такі сполуки з пригнічувальною активністю як бактеріоцини, бактеріоциноподібні сполуки, перекис водню, сідерофори, біосурфактанти [Klewicka et al., 2004; Audisio et al., 2005; Aguilar et al., 2010; Gupta et al., 2010], сполуки з антимікотичним

ефектом [Broberg et al., 2007], діацетил [Oberman et al., 1982], етанол, оцтовий альдегід [Klewicka et al., 2004].

У більшості випадків, незважаючи на такий широкий спектр антагоністичних речовин, лактобактерії проявляють антагонізм завдяки продукції органічних кислот. Відомо, що більшість МКБ є продуцентами саме молочної кислоти [Trias et al., 2008; Гармашева та ін., 2015; Uraipan et al., 2015; Klewicka et al., 2004].

Органічні кислоти утворюють основну групу серед будівельних хімічних речовин і утворюються як проміжні продукти метаболічних циклів, що утворюються у результаті мікробних процесів. Завдяки своїм функціональним групам органічні кислоти використовуються як ідеальна сировина для хімічної промисловості [Sneh et al., 2022]. Органічні кислоти зазвичай знижують внутрішньоклітинний рН і пригнічують активний транспорт надлишкових внутрішніх протонів, що включає споживання клітинним аденозинтрифосфату (АТФ) і виснажує клітини. Вони допомагають запобігти розвитку патогенних мікроорганізмів. Ключовими об'єктами цих біомолекул є клітинні стінки бактерій, цитоплазматичні мембрани та особливості метаболізму бактерій [Sneh et al., 2022].

Рівень і тип продукованих органічних кислот залежать від виду мікроорганізму, складу культурального середовища та умов вирощування [Sneh et al., 2022]. МКБ, такі як *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* і *Pediococcus*, є часто використовуваними заквасками для сквашування молока, м'яса та рослинних продуктів, які утворюють органічні кислоти як кінцеві продукти [Sneh et al., 2022].

Серед МКБ бактерії роду *Lactobacillus* є дуже важливим завдяки своїй високій кислотостійкості, високому виходу органічних кислот і продуктивності. Їх можна використати для селективного виробництва L/D молочної кислоти [Sneh et al., 2022]. Вважається, що деякі штами *Lactobacillus* виявляють імуномодулюючу активність, антигіпертензивну активність та протипухлинну активність. Крім того, лактобацили використовуються для консервування

харчових продуктів, що також називається біоконсервуванням. Воно вважається природним методом використання контрольованого мікробіому та, таким чином, збереження харчових продуктів. МКБ також природним чином продукують бактеріоцини, тобто антимікробні сполуки білкової природи, які сприяють біоконсервації їжі [Sneh et al., 2022; Bangar et al., 2022].

Особливої уваги біотехнологів заслуговують бактеріоцини з морських лактобактерій. Хоча бактеріоцини виділяються багатьма Грам позитивними та Грам негативними бактеріями [Riley et al., 2002], дані антимікробні сполуки саме з МКБ привернули особливу увагу в останні роки у зв'язку з їх потенційним застосуванням у харчовій промисловості в якості натуральних консервантів [Ennahar, 1988].

Було встановлено, що *L. acidophilus* 30SC володіє високою кислотостійкістю і синтезує термостабільний антимікробний білок, який зберігає активність у широкому діапазоні рН і пригнічує ріст ряду Грам позитивних бактерій, включаючи *L. ivanovii*. Відомо також про корисні властивості даного штаму при виробництві молочних продуктів і харчових добавок [Oh et al., 2000].

Штам *Carnobacterium* sp. виділений з кишківника атлантичного лосося, був успішно введений лососям і зменшував кількість випадків захворювань, викликаних *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio ordalli* і *Yersinia ruckeri* [Robertson et al., 2000]. Бактерії виду *Lactobacillus fructivorans*, виділені з кишківника морського окуня, значно поліпшували виживання личинок і мальків морського окуня і стимулювали їх імунну систему [Picchietti et al., 2007].

Merrifield et al. [2010] та Ringo et al. [2010] вивчали можливість застосування лактобактерій в якості пре- і пробіотиків для лососевих риб. Незважаючи на успішну розробку даних концепцій, вченим все ще важко знайти стратегію їх застосування на широкому рівні. Наука про пробіотики в аквакультурі знаходиться ще в зародковому стані [Azad et al., 2008], і існує реальна проблема в розробці кормів для риб з корисним ефектом.

Здається цікавим використання лактобактерій з морських джерел виділення для ферментації морських водоростей. Такі МКБ характеризуються здатністю використовувати морські водорості в якості єдиного джерела вуглецю. Слід зазначити, що морські водорості є не лише харчовим продуктом, але й багатим джерелом біологічно активних сполук. Добре відомо про використання у біотехнології бурих водоростей роду *Sargassum* через різноманіття проявів їх біологічної активності, включаючи антиоксидантну, антикоагулянтну, антимікробну, протизапальну, протипухлинну, протигерпетичну і антигіперліпідемічну активність [Shobharani et al., 2012]. Кілька синтетичних антиоксидантів, таких як бутильований гідроксіанізол, бутильований гідроксил толуол і третинний бутилгідроксикислот, показали багатообіцяючий ефект завдяки своїй активності по видаленню вільних радикалів, діючи в якості донорів водню або електронів і, таким чином, захищаючи організм від дегенеративних захворювань. Однак, безпечність таких синтетичних антиоксидантів викликає сумнів. Через це зростає попит на безпечніші альтернативні антиоксиданти, які є нетоксичними та активнішими при низькій вартості виробництва [Shobharani et al., 2012]. Є велика кількість повідомлень про антикоагулянтну активність фуканів, сульфатованих полісахаридів бурих водоростей [Caetano-Silva et al., 2005].

Таким чином, враховуючи усе вищенаведене, можна підсумувати, що лактобактерії, в тому числі й морського походження, виділяють сполуки з антимікробними властивостями та мають широкий біотехнологічний потенціал.

2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Робота виконувалась у Біотехнологічному науково-навчальному центрі та на кафедрі мікробіології, вірусології та біотехнології ОНУ імені І.І. Мечникова впродовж 2022-2023 років.

2.1. Штами бактерій та умови їх культивування

Для вивчення антагоністичної активності до умовно патогенних бактерій нами було використано ізоляти МКБ зі зразків чорноморських мідій *M. galloprovincialis* Lamarck і води Чорного моря, які були виділені нами з проб, відібраних на біостанції ОНУ, з Одеської затоки Чорного моря при проведенні попередніх досліджень (Табл. 1).

На першому етапі нами було проведено скринінг набору ізолятів морського походження на здатність продукувати антимікробні сполуки проти двох штамів умовно-патогенних бактерій, потім відібрано найактивніші з них та вивчено природу даних речовин.

Таблиця 1

Використані в роботі ізоляти МКБ

Ізолят лактобактерій	Походження
В.1.1	морська вода
В.1.2	морська вода
В.1.3	морська вода
В.1.4	морська вода
В.1.5	морська вода
В.1.дк	морська вода
В.2.3	морська вода
В.2.4	морська вода
М4.1	Мідії
М5.1	Мідії
М5.2	Мідії

M7.1	Мідії
M7.2	Мідії

МКБ зберігали на чашках Петрі при +4 °С періодичним культивуванням, пересіваючи кожного місяця. Вирощували МКБ на щільному поживному середовищі «de Man, Rogosa, and Sharpe» (MRS) при 37 °С для субкультури. Середовище MRS містило 5 г дріжджового екстракту, 10 г м'ясопептоного бульйону, 10 г пептону, 1 мл Твіну 80, 20 г глюкози, 2 г двоосновного фосфату калію (K₂HPO₄), 0,58 г MnSO₄•7H₂O, 0,25 г MnSO₄•4H₂O, 5 г ацетату натрію, 15 г агар-агару на літр [De Man et al., 1960].

Штам умовно патогенних бактерій *Pseudomonas aeruginosa* В-329 був люб'язно надано к.б.н., доцентом кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології ОНУ Зінченко О.Ю., а *Klebsiella pneumoniae* ATCC10031 –д.б.н. Курченко І.М. та д.м.н. Авдєєвою Л.В. (Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного, Київ), за що висловлюємо щирю подяку.

K. pneumoniae ATCC10031 і *P. aeruginosa* В-329 зберігалися у вигляді рідкої культури при +4 °С. Для вирощування даних штамів використовували комерційний поживний бульйон Nutrient broth (Himedia, Індія). Середовище мало наступний склад: 5 г пептону, 5 г хлориду натрію, 1,5 г м'ясного екстракту, 1,5 г дріжджового екстракту на літр.

2.2. Отримання добових культур лактобактерій та визначення їх рН

Для отримання добових культур лактобактерій 5 мл MRS бульйону засівали біомасою лактобактерій, які зберігались у холодильнику при + 4 °С. Для засіву брали декілька колоній і переносили їх у MRS бульйон. Вирощували при 37 °С впродовж доби. На другий день вимірювали рН добових культур використовуючи рН-метр фірми SanXin (Китай).

2.3. Визначення антимікробної активності морських лактобактерій та відбір найактивніших антагоністів

Скринінг антимікробної активності морських лактобактерій проводили методом агарових лунок згідно з [H-Kittikun et al., 2015]. Для отримання добових культур індикаторних штамів умовно-патогенних бактерій здійснювали посів у поживний бульйон і культивували при 37 °С впродовж 24 годин. На наступний день, з метою стандартизації, вимірювали концентрацію клітин добових культур умовно-патогенних бактерій користуючись спектрофотометром SmartSpec Plus фірми Bio-Rad (США) при довжині хвилі 600 нм.

Для приготування агарових дисків додавали 20 мкл добових культур індикаторних штамів з концентрацією 10^8 клітин/мл до 20 мл попередньо розплавленого та трохи охолодженого 1% поживного агару (щоб кінцева концентрація клітин складала 10^6 клітин/мл). Клітини з поживним середовищем ретельно перемішували та переливали в стерильні чашки Петрі. Після застигання агару вирізали в ньому лунки діаметром 7 мм наконечником. Після цього, у кожен лунку вносили 50 мкл добових культур МКБ та залишили на одну годину при кімнатній температурі для забезпечення дифузії антимікробних сполук лактобактерій в агар. Інкубацію здійснювали при 37 °С впродовж доби [H-Kittikun et al., 2015] .

На наступний день перевіряли чашки Петрі та відмічали наявність зон інгібування. За їх наявності вимірювали діаметр в мм.

2.4. Статистична обробка даних

Досліди виконували в двох-трьох повторах. Статистичну обробку даних проводили в програмі Microsoft Office Excel 2010. Визначали середнє арифметичне, стандартне відхилення та довірчий інтервал. Графіки будували в Microsoft Office Excel 2010 та на основі довірчого інтервалу виставляли планки погрішності.

2.5. Напрацювання метаболітів з антимікробними властивостями та визначення їх природи

Перевірку активності та визначення природи інгібувальних речовин також проводили методом агарових лунок з використанням штамів-індикаторів *K. pneumoniae* ATCC10031 і *P. aeruginosa* В-329, як описано раніше. Однак, у зроблені лунки вносили не добову культуру, а декілька варіантів надосадової рідини (НОР). Для її напрацювання, добові культури МКБ центрифугували при 10000xg протягом 10 хв при температурі +4 °C за допомогою центрифуги фірми Eppendorf (Германия). Після цього, НОР відділяли від осівших клітин та розділяли її на дві пробірки. Одну із них залишили з вихідним, кислим рН, а в другій пробірці рН НОР доводили до нейтрального значення за допомогою 1М NaOH. Стерилізація здійснювалась шляхом прогрівання при 100 °C на водяній бані протягом 10 хв [Schillinger et al., 1989; Hwanhlem et al., 2015].

Агарові диски з індикаторними штамми готували як описано раніше. Після охолодження НОР до кімнатної температури в лунки вносили по 50 мкл кислої НОР та такої з нейтральним рН у двох повторях. Бактерії культивували при 37 °C протягом ночі та обстежували на наявність чітких зон інгібування росту [Schillinger et al., 1989; Hwanhlem et al., 2015].

3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Визначення рН добових культур

Дослідження починали з отримання добових культур морських МКБ шляхом їх культивування в MRS бульйоні при 37 °С впродовж 24 годин та вимірювання їх рН. Результати досліджень представлено в табл. 2.

Таблиця 2

Значення рН добових культур лактобактерій з морської води та мідій

Ізолят лактобактерій	Значення рН
В.1.1	4,31
В.1.2	4,31
В.1.3	4,29
В.1.4	4,28
В.1.5	4,28
В.1.дж	4,30
В.2.3	4,37
В.2.4	4,41
М4.1	5,14
М5.1	6,04
М5.2	4,98
М7.1	5,08
М7.2	4,95
MRS бульйон	6,51

Виділені ізоляти закисляли середовище культивування понижуючи рН нижче 7,0. Можна помітити, що ізоляти МКБ виділенні з морської води понижували рН культуральної рідини до 4– 4,5, а ізоляти виділенні з мідій – до рН 5–6. Це свідчить про те, що МКБ, які були виділені з морської води є активнішими кислотоутворювачами порівняно із такими, що були виділені з мідій.

Відомо, що вираженість антимікробної активності МКБ може суттєво залежати від рН їх культуральної рідини. При дослідженнях антимікробної активності лактобактерій у більшості випадків штами з вищим кислотоутворенням мали сильнішу антагоністичну активність [Чорногор та ін., 2006]

3.2. Інгібувальна активність морських лактобактерій проти умовно-патогенних бактерій

Результати вивчення антимікробної активності лактобактерій, виділених з морської води та мідій, проти умовно-патогенних мікрорганізмів *P. aeruginosa* В-329 і *K. pneumoniae* АТСС10031 представлено на Рис. 1.

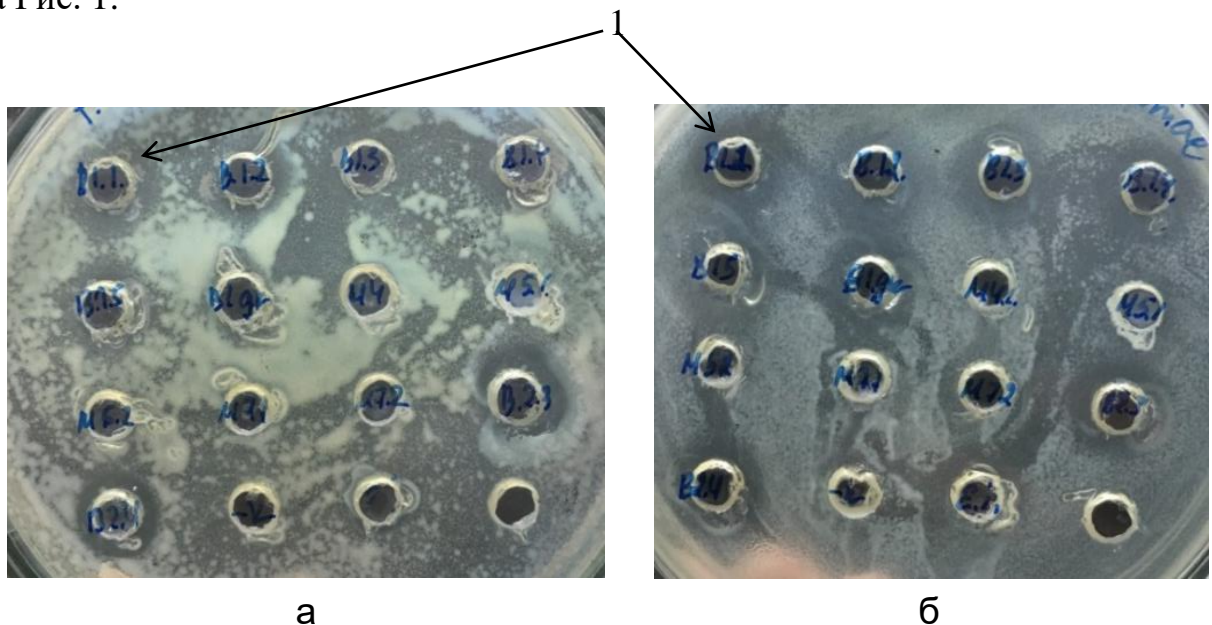


Рис. 1. Інгібувальна активність культур МКБ з морської води та мідій проти умовно патогенних бактерій *P. aeruginosa* В-329 (а) та *K. pneumoniae* АТСС10031г (б): 1 – зони інгібування росту

Так, лише ізоляти МКБ, виділенні з морської води, інгібували ріст синьогнійної палички (Рис. 1а, рис. 2). Дійсно, добова культура ізоляту МКБ В.1.1 призводила до утворення зони інгібування діаметром $11,6 \pm 0,65$ мм, В.1.2 – $12,2 \pm 0,86$ мм, В.1.3. – $12,3 \pm 0,65$ мм, В.1.4 – $12,2 \pm 0,33$ мм, В.1.5 – 13 ± 2

мм, В.2.3 – $12,5 \pm 0,98$ мм. Дані ізоляти виявилися найактивнішими проти *P. aeruginosa* В-329.

Добові культури інших двох штамів - МКБ В.2.4 та В.1.д.к формували зони затримки росту патогенів з меншим діаметром – $10,5 \pm 0,98$ мм і $9,5 \pm 1,02$ мм, відповідно. На відміну від ізолятів із морської води, ізоляти, які були виділенні із мідій – МКБ М.4.1, М.5.1, М.5.2, М.7.1, М.7.2 не проявили зовсім інгібувальної активності проти використаних індикаторних штамів. Дані ізоляти не використовувалися для наступного етапу роботи.

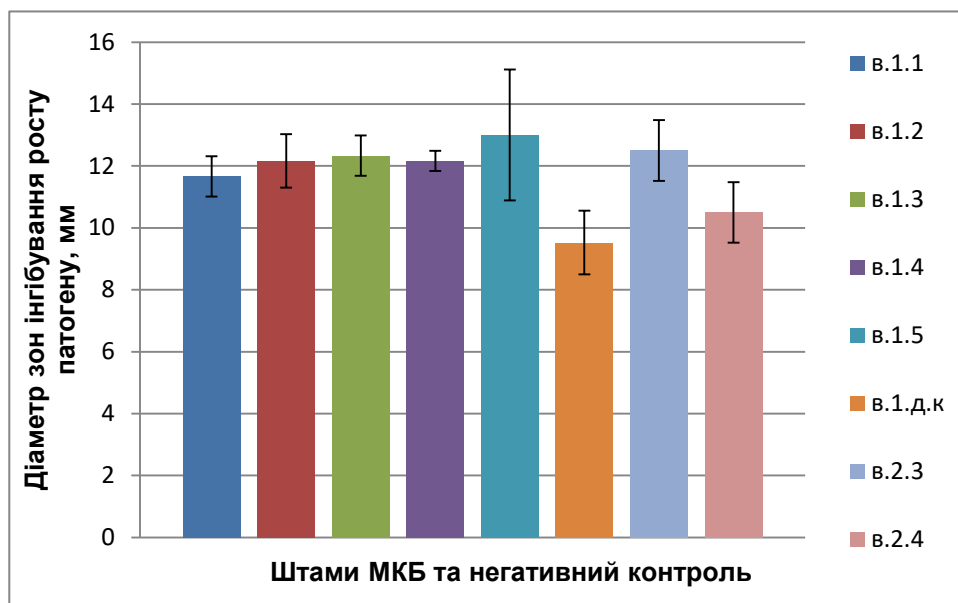


Рис. 2. Антимікробна активність морських МКБ проти *P. aeruginosa* В-329

В Україні 45,5 % резистентних до терапії гнійнозапальних захворювань викликають бактерії виду *P. aeruginosa* і близько 50 % нозокоміальних штамів синьогнійної палички в хірургічних стаціонарах стійкі до дії антибіотиків (карбапенемів, фторхінолонів, цефалоспоринів III-IV поколінь, амікацину і гентаміцину) [Лазоришинець та ін., 2009]. Вирішенням проблеми лікування синьогнійної інфекції можна реалізувати різноманітними шляхами: синтез нових ефективних антибіотиків, застосування комбінованої антибіотикотерапії, місцева терапія ранової інфекції антисептиками, які мають високу активність щодо *P. aeruginosa* [Ковальчук та ін., 2014; Нагайчук та ін., 2014].

На сьогоднішній день є кілька класів антимікробних засобів із потужною активністю проти *P. aeruginosa* (пеніциліни та цефалоспорини розширеного спектру дії, карбапенеми, азтреонам, фторхінолони та аміноглікозиди). Доріпенем – це ін'єкційний карбапенем, який розробляється Peninsula Pharmaceuticals [Jones et al., 2004; Ge et al., 2004]. Однак, зростання стійкості до антибіотиків потребує пошуку нових лікарських засобів, у якості яких можуть виступати й антимікробні метаболіти, отримані в наших експериментах.

Що стосується антимікробної активності проти *K. pneumoniae* ATCC10031, то ізоляти, які були виділені з мідій і в цьому випадку не проявили жодної активності проти даного патогену. Однак, усі ізоляти МКБ, виділені з морської води, показали інгібувальну активність проти даного індикаторного штаму приблизно в однаковій мірі (Рис. 3).

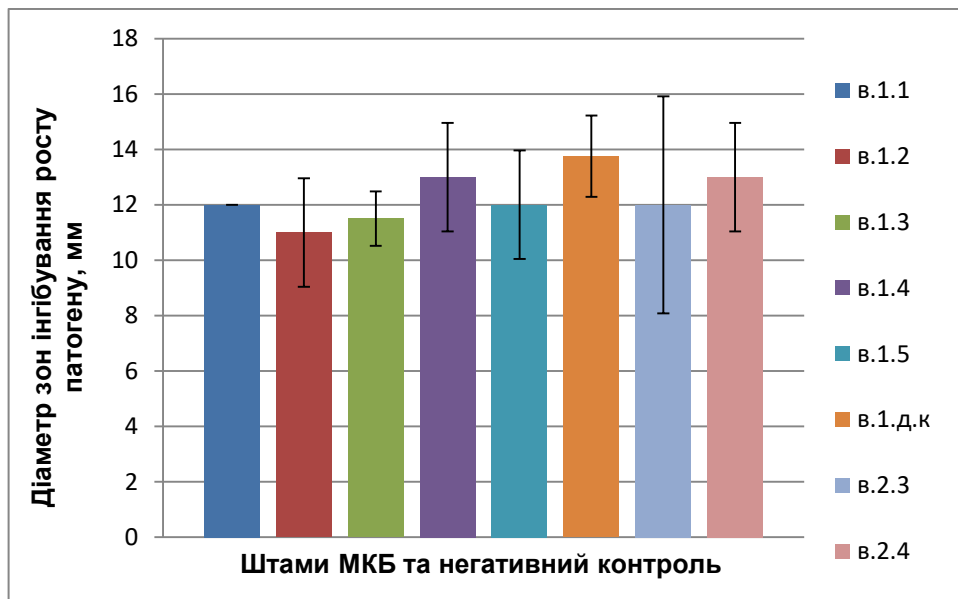


Рис. 3. Антимікробна активність ізолятів МКБ з морської води та мідій проти *K. pneumoniae* ATCC10031

Так, діаметри зон інгібування, спричинені добовими культурами даних ізолятів МКБ склали від $11,5 \pm 0,98$ мм до $13,75 \pm 1,47$ мм.

Клебсієли, в тому числі найбільш поширений представник цього роду – *K. pneumoniae*, швидко стали відомими завдяки зростанню резистентності до більшості антибіотиків останнього ряду. За даними Shiri et al. [2017], на бактерії цього виду припадає приблизно одна третина всіх Грам негативних інфекцій, таких як захворювання сечовивідних шляхів, цистит, пневмонія, інфекції хірургічних ран, ендокардит і септицемія. Вони також викликають некротизуючу пневмонію, гнійні абсцеси печінки та ендогенний ендoftальміт [Podschun et al., 1998].

В Україні 50% ізолятів *K. pneumoniae* є стійкими до цефалоспоринів 3-го покоління та 50% – до карбапенемів. Це вказує на найгіршу ситуацію у Європі [Westblade et al., 2019].

Отже, у результаті скринінгу на наявність антимікробної активності проти умовно-патогенних бактерій нами було відібрано 8 ізолятів, які були виділені з морської води: МКБ В.1.1, В.1.2, В.1.3, В.1.4, В.1.5 та В.2.3. Антимікробні сполуки, що продукуються даними штамми, можна розглядати у якості альтернативних антимікробних препаратів для медицини та для покращення санітарного стану водойм.

3.3. Напрацювання антимікробних сполук морських МКБ та визначення їх природи

Як правило, антагоністичні властивості МКБ описуються у літературі досить повно та антимікробна дія цих мікроорганізмів у більшості випадків обумовлена дією молочної кислоти, основного метаболіту, який знижує рН середовища [Чорногор та ін., 2006].

НОР, яка була напрацьована на основі ізолятів морських МКБ, як кислу так і з нейтральним рН, було перевірено на антимікробну активність проти умовно патогенних бактерій *P. aeruginosa* В-329 та *K. pneumoniae* АТСС10031. У даних експериментах використовувалися лише ізоляти з морської води, які проявили антимікробну активність під час первинного скринінгу.

У результаті проведених досліджень встановлено, що напрацьована НОР з кислим, вихідним рН більшості перевірених ізолятів інгібувала ріст обох індикаторних штамів патогенних бактерій (Рис. 4, табл. 3 – 4). Вийняток складала НОР ізоляту МКБ В2.4, яка не проявила своєї антимікробної активності, на відміну від добової культури даного ізоляту. Це можна пояснити тим, що НОР, на відміну від культури, проходила стерилізацію кипятінням на водяній бані, що могло призвести до руйнування термолабільних антимікробних сполук.

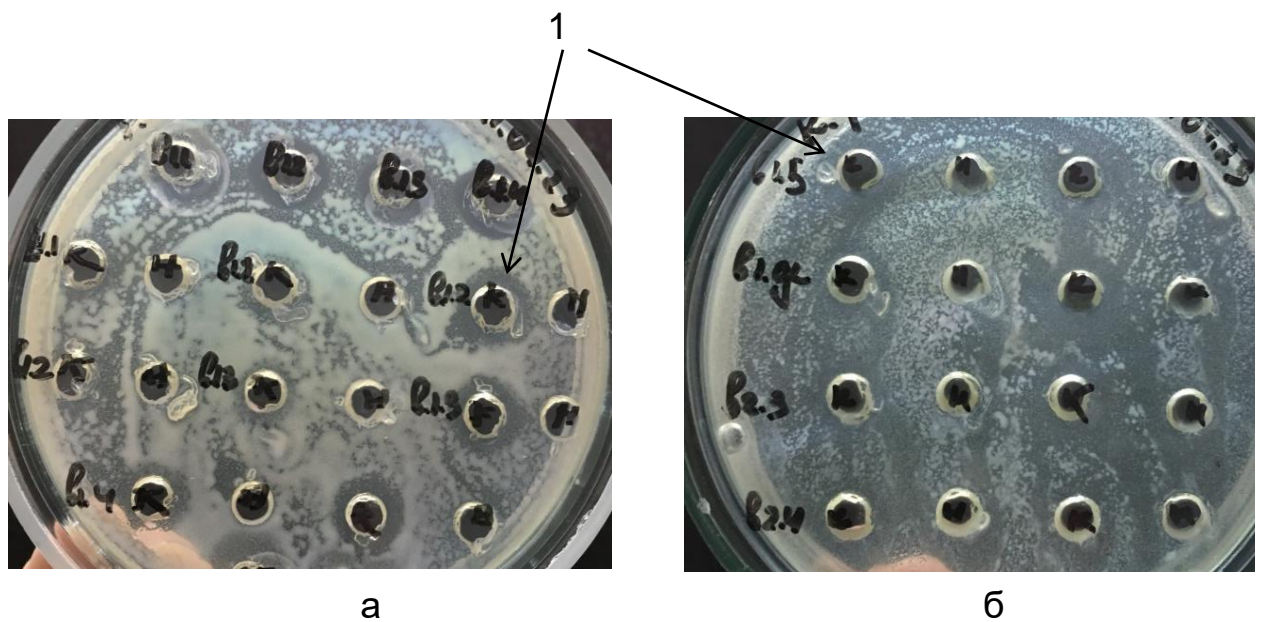


Рис. 4. Інгібувальна активність антимікробних сполук, напрацьованих на основі МКБ морського походження, проти умовно патогенних бактерій *P. aeruginosa* В-329 (а) та *K. pneumoniae* ATCC10031 (б): 1 – зони інгібування росту

НОР з вихідним рН інших ізолятів інгібували ріст як *P. aeruginosa* В-329 так і *K. pneumoniae* ATCC10031. Більш чутливими до дії кислих НОР виявилися бактерії штаму *K. pneumoniae* ATCC10031, оскільки діаметри зон інгібування складали від 9,5 мм до 13,5 мм. Інгібувальна активність даних варіантів НОР проти *P. aeruginosa* В-329 була дещо меншою – зони інгібування складали 5 – 11,5 мм.

Таблиця 3.

Визначення активності та природи антимікробних сполук ізолятів МКБ з морської води, що діють на умовно-патогенні бактерії *P.*

***aeruginosa* В-329**

Ізолят МКБ	НОР з вихідним рН		НОР з нейтралізованим рН	
	Наявність інгібувальної активності (+/-)	Середній діаметр зон інгібування (мм)	Наявність інгібувальної активності (+/-)	Середній діаметр зон інгібування (мм)
В.1.1	+	10	-	0
В.1.2	+	11,5	-	0
В.1.3	+	10,5	-	0
В.1.4	+	10,5	-	0
В.1.5	+	5	-	0
В.1.д.к	+	9,5	-	0
В.2.3	+	11,5	-	0
В.2.4	-	0	-	0

Після нейтралізації рН НОР антимікробна активність зникала у всіх варіантах досліду, що говорить про її кислотну природу. Органічні кислоти – це низькомолекулярні антибіактеріальні метаболіти, що продукуються МКБ. Органічні кислоти утворюються мікроорганізмами під час бродіння [Olstorpe et al., 2010]. Молочна та оцтова кислоти, а також інші органічні кислоти, відомі своїми антимікробними властивостями [Bannister et., 2000].

Таблиця 4

Визначення активності та природи антимікробних сполук ізолятів МКБ з морської води, що діють на умовно-патогенні бактерії *K.*

***pneumoniae* ATCC10031**

Ізолят МКБ	НОР з вихідним рН		НОР з нейтралізованим рН	
	Наявність інгібувальної активності (+/-)	Середній діаметр зон інгібування (мм)	Наявність інгібувальної активності (+/-)	Середній діаметр зон інгібування (мм)
В.1.1	+	12	-	0
В.1.2	+	11	-	0
В.1.3	+	9,5	-	0
В.1.4	+	11	-	0
В.1.5	+	13,5	-	0
В.1.д.к	+	12,5	-	0
В.2.3	+	12	-	0
В.2.4	-	0	-	0

Отже, нами було напрацьовано антимікробні сполуки відібраних ізолятів МКБ з морської води, що спричиняють інгібування умовно-патогенних бактерій *K. pneumoniae* ATCC10031 та *P. aeruginosa* В-329, а також визначено їх природу. Встановлено, що у випадку ізолятів МКБ В.1.1, В.1.2, В.1.3, В.1.4, В.1.5, В.1.д.к та В.2.3 отримані антимікробні сполуки мали кислотну природу. Що стосується метаболітів ізоляту МКБ В.2.4, то вони втрачали свою пригнічувальну активність після отримання НОР, ймовірно за все після етапу її кип'ятіння, що може свідчити про те, що вони є термолабільними. Не можна виключити й продукцію бактеріями даного ізоляту термолабільних бактеріоцинів. У наших подальших роботах ми плануємо визначити точний склад метаболітів морських МКБ за допомогою підходів метаболоміки.

Антимікробні сполуки досліджених ізолятів МКБ з морської води, після подальшого вивчення складу та оптимізації їх продукції, можуть бути

використаними для покращення санітарного стану води Чорного моря та інших водойм Півдня України.

3.4. Біотехнологічна схема напрацювання антимікробних сполук лактобактерій морського походження

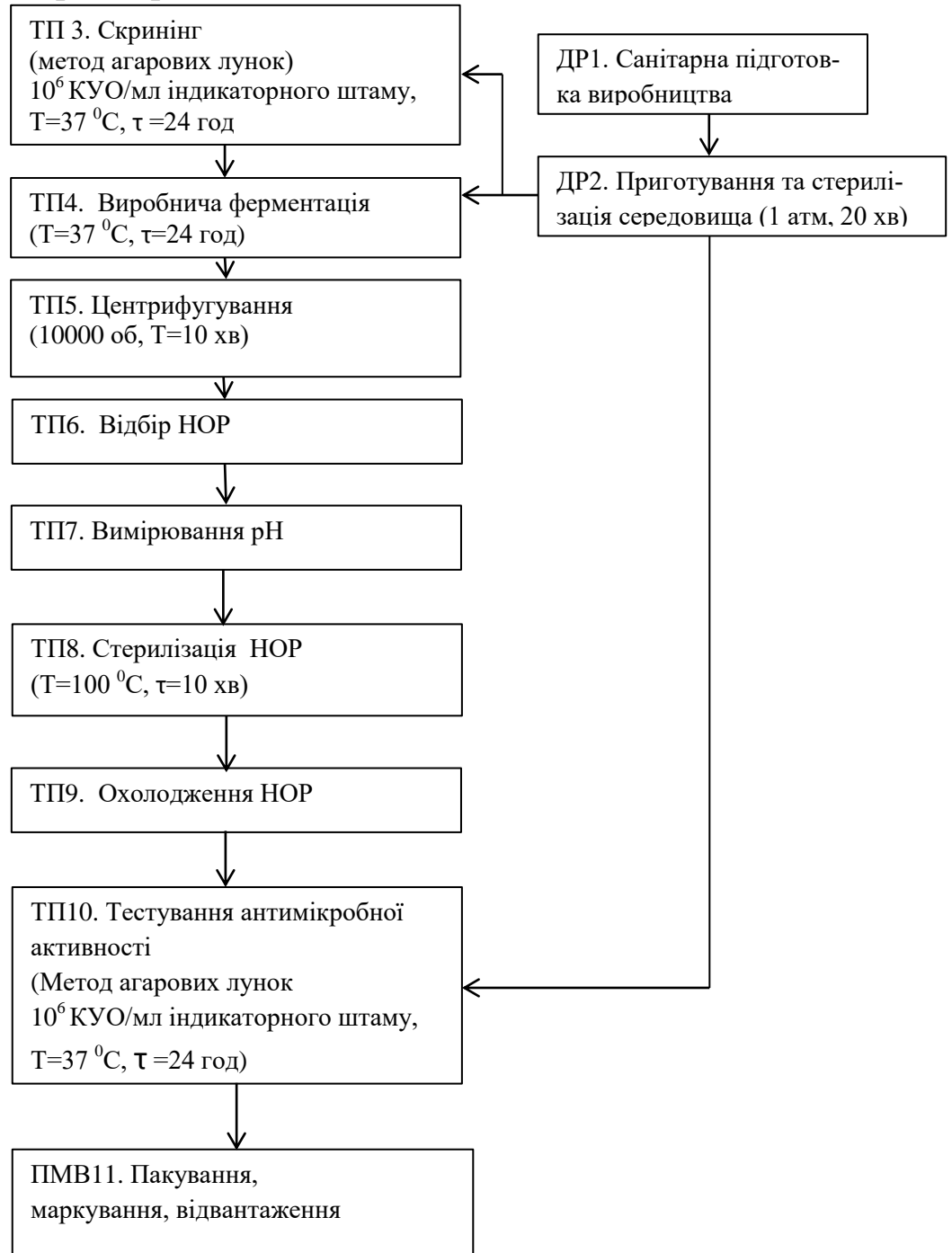


Рис. 5. Біотехнологічна схема отримання антимікробних сполук з морських лактобактерій

Нами розроблено оригінальну біотехнологічну схему по напрацюванню антимікробних сполук з морських лактобактерій (Рис. 5). Схема складається з восьми стадій основного технологічного процесу (ТП) та двох стадій допоміжних робіт (ДР).

Дана схема може бути використана для напрацювання антимікробних сполук лактобактерій, виділених з морської води, з метою їх подальшого вивчення та застосування у медичній сфері або з метою покращення санітарного стану водойм Півдня України.

ВИСНОВКИ

1. Перевірено антимікробну активність ізолятів МКБ з морської води та мідій проти умовно патогенних бактерій та встановлено, що лише лактобактерії з морської води інгібували ріст умовних патогенів *K. pneumoniae* ATCC10031 та *P. aeruginosa* B-329.
2. Відібрано найактивніші антогоністи для біотехнологічного застосування, якими виявилися ізоляти з морської води МКБ В.1.1, В.1.2, В.1.3, В.1.4, В.1.5 та В.2.3.
3. Отримано антимікробні сполуки з морських МКБ та встановлено, що, в більшості випадків, природою інгібувальної активності була дія органічних кислот.
4. Розроблено оригінальну біотехнологічну схему для напрацювання антибактеріальних сполук з морських МКБ, що складається з восьми стадій основного технологічного процесу.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Василюк О.М., Антагоністичні властивості штамів *Lactobacillus plantarum*, ізольованих із традиційних ферментованих продуктів України / О.М. Василюк, Н.К. Коваленко, І.Л. Гармашева // Мікробіол журн. – 2014а. – №. 76 (3). – С. 24–30.
2. Гармашева І.Л., Дослідження природи антагоністичної дії штамів *Lactobacillus plantarum* щодо умовно-патогенних та фітопатогенних мікроорганізмів / І.Л. Гармашева, О.М. Василюк, Н.К. Коваленко та ін // Мікробіологія і біотехнологія. – 2015. - № 2. – с. 49-58.
3. Ковальчук В.П. Посилення протимікробної активності антибіотиків сполуками четвертинного амонію / В.П. Ковальчук, Ю.Ю. Трофіменко, Н.С. Фоміна, С.В. Бобрук // Українські медичні вісті. – 2014. – Т. 11, № 1–4 (80–83). - С. 406.
4. Кулієв А.А. Порівняння антимікробної активності різних штамів бактерій роду *Lactobacillus* проти низки патогенних бактерій / А.А. Кулієв, К. Демнерова, У.Д. Абдуллаєва // Biology. - 2017. - № 3. – С. 15-20.
5. Лазоришинець В.В. Антибіотикорезистентність нозокоміальних штамів *Pseudomonas aeruginosa* в хірургічних стаціонарах України в 2009 році / В.В. Лазоришинець, В.Ф. Марієвський, А.Т. Салманов // Харківська хірургічна школа. – 2010. – № 6 (44). – С. 71–75.
6. Нагайчук В.І. До характеристики сучасних ускладнень у хворих з опіками / В.І. Нагайчук, О.А. Назарчук, І.Г. Палій [та ін.] // Український медичний часопис. – 2014. – № 5 (103). – С. 123–126.
7. Черногор Н.П. Антагоністична активність молочнокислих бактерій / Н.П. Черногор, В.Л. Большакова, А.І. Вінніков // Журнал УДК. – 2006. –5 С. 187–190.
8. Aguilar C., Effect of the temperature on the antagonistic activity of lactic acid bacteria against *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* / C. Aguilar, B. Klotz // J Food Saf. – 2010. – V. 30(4). – P. 996-1015.

9. Amel A.M., Anti-adherence potencial of *Enterococcus durans* cells and its cell-free supernatant on plastic and stainless steel against foodborne pathogens / A.M. Amel, B. Farida, S. Djamila // *Folia Microbiol.* – 2015. – V. 60 (4). – P. 357-363.
10. Ammor S. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility. 2 – Behaviour of pathogenic and spoilage bacteria in dual species biofilms including a bacteriocin-like-producing lactic acid bacteria / S. Ammor, G. Tauveron, E. Dufour et al. // *Food Control.* – 2006. – V. 17. – P. 462–468.
11. Arena M.P. Use of *Lactobacillus plantarum* strains as a bio-control strategy against food-borne pathogenic microorganisms / M.P. Arena, A. Silvain, G. Normanno et al. // *Front Microbiol.* – 2016. – V. 7. – P. 1–10.
12. Audisio M. C., Bacteriocin from honeybee beebread *Enterococcus avium*, active against *Listeria monocytogenes* / M. C. Audisio, H.R. Terzolo, M.C. Apella // *Appl Environ Microbiol.* – 2005. – V. 71(6). – P. 3373-3375.
13. Austin B., Novel pharmaceutical compounds from marine bacteria / B. Austin // *J Appl Bacteriol.* – 1989. - V. 67. – P. 461-470.
14. Aymerich M.T., Bacteriocin-producing lactobacilli in Spanish-style fermented sausages: Characterization of bacteriocin / M.T. Aymerich, M. Garri-ga, J. M. Monfort et al // *Food Microbiol.* – 2000. - V. 87. – P. 33-45.
15. Azad I. S. Autochthonous aquaculture probiotics e a critical analysis / I. S. Azad, A. Ai-Marzouk // *Res. J. Biotechnol.* - 2008. – P. 171-177.
16. Bangar S. Organic acids production from lactic acid bacteria: A preservation approach / S. Bangar, S. Shweta, T. Monica, O. Fatica // *Food Bioscience.* – 2022. – V. 46: 101615.
17. Bannister B.A., *Infectious Disease*. 2nd ed. Blackwell Science / B.A. Bannister, N.T. Begg, S.H. Gillespie // Malden, MA, USA. – 2000. – V. 2. – P. 29–38.

18. Bernan V. S. Marine microorganisms as a source of new natural products / V. S. Bernan, M. Greenstein & W. M. Maisese // *Adv Appl Microbiol.* – 1997. - V. 43. – P. 57-90.
19. Broberg Anders Metabolite Profiles of Lactic Acid Bacteria in Grass Silage / Anders Broberg, Karin Jacobsson, Katrin Ström, Johan Schnürer // *Appl Environ Microbiol.* – 2007. – V. 73. – P. 5547-5552.
20. Bucio A., Presence of *Lactobacilli* in the intestinal content of freshwater fish from a river and from a farm with a recirculation system / A. Bucio, R. Hartemink, J. W. Schrama, et al. // *Food Microbiol.* - 2006. – V. 23. – P. 476–482.
21. Caetano-Silva M. E. FAO/WHO: Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. FAO of the UN and WHO Expert Consultation Report. – Cordoba. - 2005.
22. De Man J.C., A medium for the cultivation of *Lactobacilli*/ J.C. De Man, M. Rogosa, M.E. Sharpe // *Journal appl. Bacteria.* – 1960. – V. 23(1). – P. 130-135.
23. De Vuyst L. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria / L. De Vuyst, E.J. Vandamme // *Microbiology, Genetics and Applications.* – London: Blackie Academic and Professional. - 1994.
24. Desniar Choesri Characterization of lactic acid bacteria isolated from an Indonesian fermented fish (bekasam) and their antimicrobial activity against pathogenic bacteria / Choesri Desniar, Imar Rusmana // *Emirates Journal of Food and Agriculture.* – 2013. – V. 25(6). – P. 489-493.
25. Elayaraja S. Production, purification and characterization of bacteriocin from *Lactobacillus murinus* AU06 and its broad antibacterial spectrum / S. Elayaraja, N. Annamalai, P. Mayavu et al. // *Asian Pac J. Trop Biomed.* – 2014. – V. 4. – P. 305-311.
26. Ennahar S. Class IIa bacteriocins from lactic acid bacteria: antibacterial activity and food preservation / S. Ennahar, K. Sonomoto, A. Ishizaki // *J Biosci Bioeng.* – 1999. - V. 87. – P. 705–716.

27. Franzmann P. D., Psychrotrophic, lactic acid-producing bacteria from anoxic waters in ice lake, Antarctica / P. D. Franzmann, P. Hopfi, N. Wiess, B. J. Tindall // *Arch Microbiol.* – 1991. – V. 156. – P. 255-262.
28. Françoise L., Occurrence and role of lactic acid bacteria in seafood products / L. Françoise // *Food Microbiol.* – 2010. – V. 27 (6). – P. 698–709.
29. Gatesoupe F. J., The use of probiotics in aquaculture / F. J. Gatesoupe // *Aquaculture.* – 1999. – V. 180. – P. 147–165.
30. Ge Y., In vitro antimicrobial activity of doripenem, a new carbapenem / Y. Ge, M.A. Wikler, D.F. Sahn, R.S. Blosser-Middleton, J.A. Karlowsky // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2004. – V. 48. – P. 1384-96.
31. Gupta H., Purification and characterization of enterocin FH 99 produced by a faecal isolate *Enterococcus faecium* FH 99 / H. Gupta, R.K. Malik, A. Bhardwaj et al. // *Indian J Microbiol.* – 2010. – V. 50(2). – P. 145- 155.
32. H-Kittikun A., Bacteriocin-producing *Enterococcus faecalis* KT2W2G isolated from mangrove forests in southern Thailand: Purification, characterization and safety evaluation / A. H-Kittikun, B. Vanessa, El. Shady et al. // *Food Control.* – 2015. – V. 54. – P. 126-134.
33. Holzappel W. H. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes / W. H. Holzappel, R. Geisen, U. Schilliger // *Int J Food Microbiol.* – 1995. - V. 24. – P. 343-362.
34. Hwanhlem N. Application of a nisin Z-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KT2W2L isolated from brackish water for biopreservation in cooked, peeled and ionized tropical shrimps during storage at 8 °C under modified atmosphere packaging / N. Hwanhlem, E. Jaffrès, X. Dousset, G. Pillot, Y. Choiset et al. // *European Food Research and Technology.* – 2015. – V. 240. – P. 1259–1269.
35. Ibryamova S., Antifungal activity of Lactic acid bacteria, isolated from (*Mytilus Galloprovincialis* Lam.) in the Bulgarian Black sea aquatory / S. Ibryamova, N. Arhangelova, T. Koynova et al. // *Journal of IMAB.* – 2020. – V. 10. – P. 2875.

36. Ignatova-Ivanova T. Determination of the antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from the Black sea mussel *Mytilus galloprovincialis* Larmark, 1819 / T. Ignatova-Ivanova, S. Ibryamova, D. Bachvarova, et al. // *Pharmacia*. – 2022. – V. 63(3). – P. 637–664.

37. Imhoff, J.F., Bio-mining the microbial treasures of the ocean: new natural products / J. F. Imhoff,, A. Labes, J. Wiese, // *Biotechnol Adv*. – 2011. – V. 29. – P. 468–482.

38. Inagaki F. Microbial communities associated with geological horizons in coastal subseafloor sediments from the sea of Okhotsk / F. Inagaki, M. Suzuki, K. Takai, H. Oida, T. Sakamoto et al // *Appl Environ Microbiol*. – 2003. - V. 69. – P. 7224-7235.

39. Indira K, Bio preservative potential of marine *Lactobacillus* spp. / K. Indira, S. Jayalakshmi, A. Gopalakrishnan and M. Srinivasan // *African Journal of Microbiology*. – 2011. – V. 5. – P. 2287–2296.

40. Ishikawa M. *Marinilactibacillus psychrotolerans* gen. nov., sp. nov., a halophilic and alkaliphilic marine lactic acid bacterium isolated from marine organisms in temperate and subtropical areas of Japan / M. Ishikawa, K. Nakajima, M. Y. Yamamoto, K. Yamasato // *Int J Syst Evol Microbiol*. – 2005. – V. 53. – P. 711-720.

41. Jayanth K. Isolation of marine bacteria, antagonistic to human pathogens / K. Jayanth, G. Jeyasekaran & R. Jeya Shakila // *Indian J Mar Sci*. – 2002. - V. 31. – P. 39-44.

42. Jones R.N. Sader. Doripenem (S-4661), a novel carbapenem: comparative activity against contemporary pathogens including bactericidal action and preliminary *in vitro* methods evaluations / R.N. Jones, H.K. Huynh, D.J. Biedenbach, T.R. Fritsche, H.S. // *J Antimicrob Chemother*. – 2004. – V. 54. – P. 144–54.

43. Kathiresan K. Prospects of lactic acid bacteria of marine origin / K. Kathiresan, G. Thiruneelakandan // *Indian Journal of Biotechnology*. – 2008. – V. 7. – P. 170-177.

44. Khouadja S. Selection of lactic acid bacteria as candidate probiotics for *Vibrio parahaemolyticus* depuration in pacific oysters (*Crassostrea gigas*) / S. Khouadja, N. Haddaji, M. Hanchi, A. Bakhrouf // Aquaculture Research. – 2017. – V. 48 (4). – P. 1885–1894.
45. Kim M-Ju, Antilisterial effect of bacteriocin SH01, obtained from *Enterococcus faecium* SH01, in ground beef / M-Ju Kim, M. Jung, W.J. Kim // Korean J. Food Sci An. – 2015. – V. 35 (2). – P. 211-215.
46. Klewicka E., Antagonistic activity of *Lactobacillus acidophilus* bacteria towards selected food-contaminating bacteria / E. Klewicka, Z. Libudzisz // Pol J Food Nutr Sci. – 2004. – V. 13/54(2). – P. 169-174.
47. Korotaeva N.V., Effect of *Lactobacillus plantarum* ONU87 in mixture with autolysate of erwinias on formation of tumors caused by *Rhizobium radiobacter* C58 / N.V. Korotaeva, T.V. Kondratiuk, O.V. Basiul et al.// Microbiology and Biotechnology. – 2013. – V. 2. – P. 6-14.
48. Limanska N.V. Effect of 140 *Lactobacillus plantarum* on tumor formation caused by *Rhizobium radiobacter* / N.V. Limanska, N.V. Korotaeva, G.V. Yamborko et al. // Microbiology and Biotechnology. – 2014. – V. 1.–P. 8–18.
49. Lindgren S. W. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations / S. W. Lindgren, W. J. Dobrogosz // FEMS Microbiol Rev. – 1990. - V. 87. – P. 149-164.
50. Makras L. Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds / L. Makras, V. Triantafyllou, D. Fayol-Messaoudi, T. Adriany, G. Zoumpopoulou, E. Tsakalidou, A. Servin, L. De Vuyst // Res Microbiol. – 2006. – V. 157. – P. 241–247.
51. Merrifield D. L. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids / D. L. Merrifield, A. Dimitroglou, A. Foey, S. J. Davies, R. T. M. Baker, J. Bogwald, M. Castex, E. Ringo // Aquaculture. - 2010. - V. 302. – P. 1-18.

52. Nes I. F. Exploration of antimicrobial potential in LAB by genomics. / I. F. Nes, O. Johnsborg // *Curr Opin Biotechnol.* – 2004. – V. 15. – P. 100–104.

53. Newberry C. J. Diversity of prokaryotes and methanogenesis in deep subsurface sediments from the Nankai Trough, Leg 190, / C. J. Newberry, G. Webster, B. A. Gragg, R. J. Parkes, A. J. Weightman et al // *Ocean Drilling Program Environ Microbiol.* – 2004. – V. 6. – P. 274-287.

54. Oberman H., Production of diacetyl and acetoin by lactic acid bacteria / H. Oberman, A. Piatkiewicz, Z. Libudzisz // *Mol Nutr Food Res.* - 1982. V. 26 (7-8). – P. 615-623.

55. Oh S. Characterization and purification of a bacteriocin produced by a potential probiotic culture, *Lactobacillus acidophilus* 30SC / S. Oh, S. H. Kim & R. W. Worobo // *J Dairy Sci.* – 2000. - V. 83. – P. 2747-2752.

56. Olstorpe M. Effect of starter culture inoculation on feed hygiene and microbial population development in fermented pig feed composed of a cereal grain mix with wet wheat distillers' grain / M. Olstorpe, L. Axelsson, J. Schnurer, V. Passoth // *J. Appl. Microbiol.* – 2010. – V. 108. – P. 129–138.

57. Panigrahi A. The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mycoses* / A. Panigrahi, V. Karen, J. Puangkaew, T. Kobayashi, S. Satoh et al // *Aquaculture.* – 2004. - V. 243. – P. 241-254.

58. Pasteris S. E., Characterization of the beneficial properties of *Lactobacilli* isolated from bullfrog (*Rana catesbeiana*) hatchery / E. V. Pingitore, G. R. Babbot, M. C. Otero et al. // *Antonie van Leeuwenhoek Int J Gen Mol Microbiol.* – 2009. – V. 95. – P. 373–385.

59. Picchiatti S., Effects of administration of probiotic strains on GALT of larval gilthead seabream: Immunohistochemical and ultrastructural studies / S. Picchiatti, M. Mazzini, A. R. Taddei, et al. // *Fish Shellfish Immunol.* – 2007. – V. 22. – P. 57–67.

60. Podschun R. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. / R. Podschun, U. Ullmann // Clin Microbiol Rev. – 1998. – V. 11(4). – P. 589–603.
61. Riley M.A. Bacteriocins: evolution, ecology, and application / M. A. Riley, J. E. Wertz // Annu Rev Microbiol. – 2002. - V. 56. – P. 117–137.
62. Ringo E. Lactic acid bacteria in fish—A review, / E. Ringo, F. J. Gatesoupe // Aquaculture. – 2010. - V. 160. – P. 177-203.
63. Robertson P. A., Use of *Carnobacterium* sp as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) / P. A. Robertson, C. O’Dowd, C. Burrells, P. Williams // Aquaculture. – 2000. – V. 185. – P. 235–243.
64. Schillinger U and Lüke F-K., Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat / U. Schillinger, F-K. Lüke // Appl Environ Microbiol. – 1989. – V. 55(8). – P. 1901-1906.
65. Schnürer J. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives / J. Schnürer, J. Magnusson // Trends Food Sci Technol. – 2005. - V. 16. – P. 70–78.
66. Shekh R.M., Biochemical characterization of an anti-*Candida* factor produced by *Enterococcus faecalis* / R.M. Shekh, U. Roy // BMC Microbiol. – 2012. - V. 12. – P. 132.
67. Shiri Navon-Venezia, *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance / Navon-Venezia Shiri, Kondratyeva K., Carattoli A. // FEMS Microbiol Rev. – 2017. – V. 41(3). – P. 252–275.
68. Shobharani P. Potential of marine lactic acid bacteria to ferment *Sargassum* sp. for enhanced anticoagulant and antioxidant properties / P. Shobharani , P.M. Halami, N.M. Sachindra // Journal of Applied Microbiology. – 2012. - V. 114. – P. 96-107.
69. Sneha Punia Bangar, Organic acids production from lactic acid bacteria: A preservation approach / Sneha Punia Bangar, Suri, Shweta, Trif Monica, Ozogul Fatih // Food Bioscience. – 2022.- V. 46. – P.

70.Sowmya R. Antioxidative properties of seaweed components/ R. Sowmya, N. M. Sachindra, M. Hosokawa, K. Miyashita // In Seaweeds: Ecology, Nutrition and Health Benefits ed. Pomin. – 2011. - V. 1. - P. 137–162.

71.Spielmeyer W. K. Phylogeny of the Antarctic bacterium *Carnobacterium alterfundicum* / W. K. Spielmeyer, T. A. Mc Meekin, J. M. Miller, P. D. Franzmann // Polar Biol. – 1993. - V. 13. – P. 501-503.

72.Toffin L. *Marinilactibacillus piezotolerans* sp.nov., a novel marine lactic acid bacterium isolated from deep sub-seafloor sediment of the Nankai Trough / L. Toffin, K. Zink, C. Kato, P. Pignet, A. Bidault et al // Int J Syst Evol Microbiol. – 2005. –V. 55. – P. 345-351.

73. Trias R., Lactic acid bacteria from fresh fruit and vegetables as biocontrol agents of phytopathogenic bacteria and fungi / R. Trias, L. Baneras, E. Montesinos, E. Badosa// International Microbiology. – 2009. – V. 11(4). – P. 231-236.

74.Uraipan S., Antagonistic characteristics against food-borne pathogenic bacteria of lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from feces of healthy Thai infants / S. Uraipan, T. Hongpattarakere // Jundishapur J Microbiol. – 2015. – V. 8(6) . – P. 1- 9.

75.Varnam A. *Lactobacillus* occurrence and significance in nondairy foods / A. Varnam // Microbiol Today. – 2002. – V. 29.

76.Westblade L., Treatment of nosocomial infection in conditions of progressive multidrug resistance / L. Westblade // Health-ua.com. – 2019.